

MEMOIRE

présenté à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

pour obtenir le diplôme

D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

par

Pierre VILLENEEUE

Soutenue le **18 Décembre 2003**

à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques

devant le Jury composé de :

M. Frédéric CARRIERE

Directeur de Recherche, CNRS, Marseille

Rapporteur

M. Stéphane GUILBERT

Directeur de Recherche UMR IATE, Montpellier

Rapporteur

M. Michel PARMENTIER

Professeur, ENSAIA, Nancy

Rapporteur

Melle Elisabeth BORREDON

Professeur INPT, Toulouse

Membre

M. Sylvain CLAUDE

Proléa, Paris

Membre

M. Antoine GASET

Professeur INPT-ENSIACET, Toulouse

Membre

M. Jean GRAILLE

Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier

Membre

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1.....	4
A - INFORMATIONS GÉNÉRALES	4
B - DIPLÔMES ET FORMATION	5
C - ACTIVITÉS PROFESSIONNELLES	6
D - BILAN DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE.....	7
E - RÉSULTATS SCIENTIFIQUES	8
F - ENCADREMENT DE TRAVAUX DE RECHERCHE.....	13
G - AUTRES ACTIVITÉS	15
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE	
BIOFAÇONNEMENT DES HUILES ET CORPS GRAS À L'AIDE	
DE LIPASES VÉGÉTALES	16
I - INTRODUCTION	16
II - SPECIFICITES D'ACTION DES LIPASES	18
III - METHODES DE DETERMINATION DES SPECIFICITES DES LIPASES	21
III - 1 Hydrolyse de Triacylglycérols homogènes	21
III - 2 Hydrolyse d'analogues de triacylglycérols	23
III - 3 Hydrolyse de TAG de synthèse	24
IV - TRAVAUX DE THESE : MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETERMINATION	
DE SPECIFICITES LIPASIQUES.....	25
IV - 1 Synthèse chirale des substrats triglycéridiques hétérogènes.....	27
IV - 2 Exemple de déterminations des spécificités d'action de différentes lipases	
d'origines animale, microbienne ou végétale.	30
V - OPERATIONS DU BIOFAÇONNEMENT DES CORPS GRAS ET AVANTAGES POTENTIELS	
DES LIPASES VEGETALES.....	32
V - 1 Type de réactions du biofaçonnement des corps gras	32
V-2 Conditionnement des lipases et facteurs influençant leurs activités de catalyse	35
V - 3 Valorisation et applications des lipases végétales	37
VI - CARACTERISATION DE L'ACTIVITE BIOCATALYTIQUE DU LATEX DE <i>CARICA PAPAYA</i>	
POUR LE BIOFAÇONNEMENT DES CORPS GRAS.....	40

VI - 1 Valorisations industrielles de l'activité protéolytique du latex de <i>Carica papaya</i>	40
VI- 2 Activité lipolytique du latex de <i>Carica papaya</i>	41
VI - 3 Caractérisation de l'activité acyltransférase du latex de <i>Carica papaya</i>	42
VII - EXEMPLES DE VALORISATION DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE DU LATEX DE <i>CARICA PAPAYA</i> DANS DES OPERATIONS DE BIOFAÇONNEMENT DES CORPS GRAS.....	49
VII - 1 Production de substituts de matières grasses de type triacylglycérols structurés à faibles calories.....	49
VII - 2 Production de triacylglycérols restructurés à chaînes moyennes	52
VIII - AUTRES SOURCES POTENTIELLES DE LIPASES VEGETALES	57
VIII - 1 Étude de l'activité lipolytique de la Bromélaïne	57
VIII - 2 Étude de l'activité lipolytique du babaco (<i>Carica pentagona</i>)	59
IX - CONCLUSION	60
CHAPITRE 3 SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE	
LIOPHILISATION ENZYMATIQUE DE BIOMOLÉCULES	63
I - INTRODUCTION	63
II - STRATEGIES DE SYNTHÈSE POUR LA LIOPHILISATION ENZYMATIQUE DE MOLECULES HYDROPHILES	65
III - LIOPHILISATION ENZYMATIQUE DE DERIVES DE SUCRES : EXEMPLE DE LA SYNTHÈSE D'ESTERS GRAS D'ACIDES QUINIQUE ET GLUCURONIQUE	70
IV - LIOPHILISATION ENZYMATIQUE DE DERIVES D'ACIDES AMINES : EXEMPLE DE LA SYNTHÈSE D'ESTERS GRAS D'ACIDE PYROGLUTAMIQUE	74
V - LIOPHILISATION ENZYMATIQUE DES POLYPHENOLS ET ACIDES PHENOLIQUES : CAS DES ACIDES CHLOROGENIQUES	80
VI - CONCLUSION.....	82
CHAPITRE 4 SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE CHIMIE	
DES LIPIDES	83
I - OBTENTION PAR VOIE ENZYMATIQUE DE DERIVES LIPIDIQUES	83
I-1 Esters de glycérols et d'acides dicarboxyliques.....	83
I-2 Esters de phytostérols (Travaux réalisés au CIRAD, 2002).....	87
II - ÉTUDE D'ANTIOXYDANTS NATURELS POUR LIMITER L'OXYDATION DE MATIERES GRASSES INSATUREES DE PRODUITS CEREALIERS DE CUISSON.....	91

<i>II - 1 Principe et mécanisme de l'oxydation des lipides</i>	91
II-1-1 Réaction avec l'oxygène triplet	92
II-1-2 Réaction avec l'oxygène singulet	94
II-1-3 Oxydation enzymatique	94
<i>II - 2 Prévention de l'oxydation : nature et mécanisme d'action des antioxydants</i>	95
II-2-1 Antioxydants antiradicalaires.....	96
II-2-2 Antioxydants chélateurs de métaux	99
II-2-3 Antioxydants désactivateurs de l'oxygène singulet.....	100
II-2-4 Autres types d'antioxydants.....	101
<i>II-3 Étude de différents antioxydants naturels pour la protection des huiles</i>	
<i>insaturées : Cas de lécithines</i>	102
II-3-1 Effet antioxydant des lécithines de soja huileuse, enrichies (déshuilées) ou fractionnées	104
II-3-2 Effet antioxydant de la lécithine de soja huileuse sur différentes huiles et corps gras	106
<i>II-4 Conclusion</i>	107
III - RE-EVALUATION DU PROCEDE DE DESHYDRATATION DE L'HUILE DE RICIN POUR LA PRODUCTION D'ACIDES LINOLEIQUES CONJUGUES (CLA)	108
<i>III-1 Les acides linoléiques conjugués ou CLA</i>	109
III-1-1 Effets physiologiques des isomères du CLA	110
III-1-2 Synthèses biologiques des CLA	110
III-1-3 Aliments fonctionnels enrichis en CLA	111
III-1-4 CLA et alimentation animale.....	112
<i>III - 2 Synthèse de CLA</i>	113
II-2-1 Production à partir d'huiles végétales.....	113
II-2-2 Synthèses microbiologiques.....	116
<i>III-3 L'huile de ricin</i>	116
<i>III-3 Travaux menés au CIRAD sur la déshydratation de l'huile de ricin</i>	118
III-3-1 Principe et suivi analytique de la réaction	118
III-3-2 Résultats.....	121
<i>III - 4 Conclusion</i>	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

INTRODUCTION

Titulaire d'un DEA « Chimie des biomolécules : synthèse, structure et réactivité » de l'Université des Sciences et Techniques Montpellier II, j'intègre en septembre 1992 l'actuel laboratoire de Lipotechnie du CIRAD (Montpellier) dirigé par Monsieur Jean Graille. Là, sous la direction de Monsieur Michel Pina, je débute un travail de thèse dont le but était de développer une méthode permettant de mieux caractériser les comportements catalytiques des lipases et en particulier leurs sélectivités d'action, de manière à disposer d'un outil performant pour sélectionner ces enzymes et les utiliser ensuite dans diverses opérations de biofaçonnement des corps gras.

Après l'obtention de mon Doctorat en juin 1995, je poursuis pour six mois mes travaux de recherche dans ce même laboratoire dans le cadre d'une collaboration menée avec un industriel français du secteur cosmétique. Il s'agit alors de produire par voie enzymatique des molécules du type amides gras.

Puis, à partir de janvier 1996 et pour une période de 18 mois, j'effectue alors un stage post-Doctoral au sein de la Hides, Lipids and Wool Research Unit de l'United States Department of Agriculture (USDA) à Philadelphie. Sous la tutelle du Directeur de ce laboratoire, Monsieur Tom A. Foglia, je travaille sur la synthèse enzymatique de substituts de matières grasses à faible calorie du type triacylglycérols restructurés ainsi que sur la production biocatalysée de précurseurs de biopolymères. De plus, j'interviens également pour caractériser le comportement catalytique d'une lipase microbienne génétiquement modifiée mise au point dans ce même laboratoire.

En juillet 97, je retourne au laboratoire de Lipotechnie et ce jusqu'en octobre 98. En collaboration avec un industriel européen, je mène différents projets de recherche sur la lipophilisation enzymatique de molécules hydrophiles. Il s'agit alors de greffer des chaînes grasses sur des dérivés de sucres ou d'acides aminés pour l'obtention de principes actifs pouvant entrer dans la formulation de crèmes cosmétiques.

Début 1999, je rejoins le groupe agroalimentaire Danone, en tant qu'ingénieur de recherche. Là, pendant deux ans et demi, j'interviens dans un vaste programme de

développement visant à substituer les matières grasses saturées entrant dans la composition de produits biscuitiers par des matières grasses insaturées nutritionnellement plus recherchées. J'interviens alors plus précisément sur des problèmes d'oxydation liés à l'utilisation de ces huiles insaturées et sur la mise en œuvre d'antioxydants naturels pour éviter ces phénomènes de dégradation organoleptique des produits.

Enfin, en mai 2001 je réintègre pour la troisième fois le laboratoire de Lipotechnie désormais dirigé par Michel Pina à la suite du départ à la retraite de Jean Graille en juillet 2001. De plus, dans un contexte de regroupement de nombreuses équipes de recherche montpelliéraines, le laboratoire fait dorénavant partie de l'UMR IATE (Ingénierie des Agropolymères et Technologies Émergentes) dirigée par Monsieur Stéphane Guilbert. A l'heure actuelle, j'interviens donc sur des projets variés entrant dans les différents thèmes de recherche sur lesquels le laboratoire de Lipotechnie travaille depuis plusieurs années, mais également dans de nouveaux projets liés au développement de nos activités UMR. En particulier, je suis impliqué dans la valorisation des enzymes d'origines végétales dans le cadre du biofaçonnement des corps gras et sur la fonctionnalisation douce d'agro-ressources principalement par lipophilisation enzymatique.

Le présent mémoire décrit donc une période d'un peu plus de dix ans et couvre les différentes activités de recherche que j'ai menées dans les équipes de recherche dont j'ai fait partie au CIRAD, à l'USDA et dans le groupe Danone.

Après un premier chapitre décrivant plus en détail mon curriculum vitae et mon parcours professionnel, mes activités de recherche seront déclinées sur trois chapitres :

- Le premier concerne le biofaçonnement des corps gras et plus spécifiquement la caractérisation des lipases végétales puis leur mise en œuvre dans des opérations du biofaçonnement des corps gras pour l'obtention de nouvelles huiles d'intérêt nutritionnel.
- Le second chapitre traite de la biocatalyse pour la lipophilisation de biomolécules afin d'obtenir de nouveaux produits multifonctionnels.

- Le troisième chapitre regroupe mes diverses activités liées à la chimie des lipides, dans lequel sont traités notamment mes travaux sur l'antioxydation d'huiles insaturées entrant dans la formulation des produits céréaliers ainsi que mes activités de recherche récentes dans le cadre d'un projet franco-brésilien de relance de la culture du ricin au Brésil.

Enfin, ce mémoire se termine sur une partie « conclusion et perspectives » concernant prioritairement les perspectives de recherche que j'envisage pour les années qui suivent.

Pour finir, je souhaite remercier ici chaleureusement l'ensemble de mes collègues que j'ai eu la chance de côtoyer dans les équipes de recherche dont j'ai fait partie. Que tous, stagiaires, secrétaires, techniciens et ingénieurs trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude. En particulier, je voudrais remercier vivement pour toute leur aide, leurs encouragements et leurs précieux conseils Messieurs Jean Graille, Michel Pina et Tom Foglia.

CHAPITRE 1

A - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Nom : Villeneuve
Prénom : Pierre
Date et lieu de naissance : 11 Juin 1969, Montpellier (Hérault)
Situation de famille : Célibataire

Adresse professionnelle : Laboratoire de Lipotechnie
UMR IATE
CIRAD AMIS
TA 40/16
73, rue Jean-François Breton
34398 Montpellier cedex 5
Tél : 04 67 61 55 18
Fax : 04 67 61 55 15
E-mail : villeneuve@cirad.fr

Adresse personnelle : Résidence Le Carignan
71, Cour Watt
34000 Montpellier
Tél : 04 67 15 07 97 ou 06 10 62 18 84
E-mail : pierre.villeneuve@libertysurf.fr

Langues : Anglais : courant
Allemand : connaissances scolaires

Poste actuel : Depuis avril 2002, Chercheur au Laboratoire de Lipotechnie, Programme Agroalimentaire CIRAD Montpellier

1995 Doctorat de l'Université Montpellier II (UM II)

Spécialité : Chimie organique, minérale, analytique et industrielle

Formation Doctorale : Chimie des biomolécules : Synthèse, structure et réactivité

Thèse soutenue le 13 Juin 1995 à L'UM II

Directeur de Thèse : M.P. Geneste (ENSCC, Montpellier)

Rapporteurs de Thèse : M.D. Legoy (Université La Rochelle)

B. Waegell (Université St Jérôme, Marseille)

Membres du Jury : J. Graille (CIRAD, Montpellier)

M. Pina (CIRAD, Montpellier)

G. Renard (ENSC, Montpellier)

R. Verger (CNRS, Marseille)

1992 Diplôme d'Études Approfondies : Chimie des Biomolécules :

synthèse, structure et réactivité à l'Université Montpellier II

1991 Maîtrise de Chimie (Spécialisation Chimie Organique), Université Montpellier II

C - ACTIVITÉS PROFESSIONNELLES

Depuis mai 2002 :

Chercheur CIRAD, Laboratoire de Lipotechnie (Montpellier).

UMR IATE

- Divers travaux et projets de Recherche sur Huiles et Corps Gras (Caractérisation analytique, technologie lipidique, biofaçonnement des corps gras)
- Fonctionnalisation douce des agro-ressources par la lipotechnie

De février 1999 à mai 2002 :

Ingénieur de Recherche/Chef de projet, Groupe DANONE, Centre de Recherche Danone-Vitapole (Région parisienne).

- Mise au point de nouveaux produits céréaliers à intérêt nutritionnel
- Travaux multiples dans le domaine des aliments fonctionnels
- Expertise Chimie des Lipides, Nutrition lipidique

De juin 1997 à novembre 1998 :

Chercheur CIRAD, Laboratoire de Lipotechnie (Montpellier)

Contrats privés avec le groupe Goldschmidt (Allemagne)

- Production de dérivés de type lipo-amino acides pour l'obtention de molécules à propriétés multifonctionnelles

De janvier 1996 à Juin 1997 :

Post-Doctorant, Hides, Lipids and Wool Research Unit (USDA, Philadelphia, USA)

- Utilisation de préparations enzymatiques pour la modification d'huiles végétales afin d'en améliorer les propriétés nutritionnelles
- Production de corps gras à faibles calories (en collaboration avec le groupe Nabisco)
- Polymérisation de dérivés du glycérol et obtention de nouveaux produits à activité antimicrobienne

De juin 1995 à décembre 1995 :

Chercheur CIRAD, Laboratoire de Lipotechnie (Montpellier)

Contrat privé avec le groupe Expanchimie (région parisienne)

- Production de tensioactifs par voie enzymatique

De septembre 1992 à Juin 1995 :

Thésard CIRAD, Laboratoire de Lipotechnie (Montpellier)

- Synthèse chimique chirale de triglycérides mixtes
- Étude des mécanismes et spécificités d'action de lipases
- Modification enzymatique d'huiles tropicales (huiles lauriques)

D - BILAN DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

• Publications dans des revues à comité de lecture :	19
• Manuscrits soumis à revues à comité de lecture :	6
• Publications dans des revues sans comité de lecture :	3
• Rédaction de chapitre pour ouvrage scientifique :	2
• Conférences invitées dans congrès internationaux :	3
• Communications orales avec actes publiés :	3
• Communications par voie d'affiche avec actes publiés :	5
• Synthèse de rapports de recherches partenariat industriels/laboratoires publics :	6

ENCADREMENT ET CO-ENCADREMENT SCIENTIFIQUES

○ Thèses de Doctorat :	2
○ DEA, DESS ou Stage de fin d'étude ENSCM :	3
○ Stagiaires niveaux IUT, IUP, Maîtrise :	4

E - RÉSULTATS SCIENTIFIQUES

Thèse de Doctorat

« *Intérêt des triglycérides modèles chiraux pour l'étude des spécificités des lipases.* ».
Soutenue le 13 juin 1995. Université Montpellier II. Directeur de thèse : Pr P. Geneste.

• Publications dans revues à comité de lecture : 21

Chiral synthesis of a triglyceride : example of 1-butyroyl 2-oleoyl 3-palmitoyl *sn* glycerol.

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Renard G., Graille J.
Chem. Phys. Lipids, 72, 135-141, 1994

Determination of lipase specificities through the use of chiral triglycerides and their racemics.

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J.
Chem. Phys. Lipids, 76, 109-113, 1995

***Carica papaya* latex lipase : *sn*3 Stereospecificity or short chain selectivity ? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity.**

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J.
J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 753-755, 1995

Chiral synthesis of a given triglyceride to characterise lipase specificities.

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Ozenne C., Renard G., Graille J.
Malaysian Oil Science and Technology, 4, 171-174, 1995

Determination of pregastric lipase specificity in young ruminants.

Villeneuve P., Pina M., Graille J.
Chem. Phys. Lipids, 83, 161-168, 1996

Mise en évidence des sélectivités des lipases en interestérification à l'aide d'un triglycéride chiral modèle.

Villeneuve P., Pina M., Graille J.
Oléagineux, Corps gras, Lipides, 3, 459-464, 1996

Specificity of *Carica papaya* latex in interesterification reactions.

Villeneuve P., Pina M., Skarbeck A., Graille J., Foglia T.A.
Biotech. Tech., 11, 91-94, 1997

Additive effects of mutations on the specificity of *R. delemar* lipase for medium chain length fatty acids.

Klein R.R., King G., Moreau R.A., Villeneuve P., Haas M.J.
J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1401-1407, 1997

Catalytic behavior of *Carica papaya* latex in transesterification reactions.

Villeneuve P., Skarbeck A., Pina M., Graille J., Foglia T.A.
Biotech. Tech. 11, 637-639, 1997

***Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols.**

Foglia T.A., Villeneuve P.
J. Am. Oil. Chem. Soc., 74, 1447-1450, 1997

Synthesis of polyfunctional glycerol esters : lipase-catalyzed esterification of glycerol with diesters.

Villeneuve P., Foglia T.A., Mangos T.J., Nunez A.
J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 1545-1549, 1998

Customizing lipases for biocatalysis : a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.

Villeneuve P., Muderhwa J., Haas M.J., Graille J.
J. Molec. Cat : B Enz., 9, 113-148, 2000

Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification.

Caro Y., Villeneuve P., Pina M, Reynes M., Graille J.
J. Am. Oil Chem. Soc., 77, 349-354, 2000

Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipids bioconversion.

Caro Y., Villeneuve P., Pina M., Reynes M., Graille J.
J. Am. Oil Chem. Soc., 77, 903-909, 2000

Providing biocatalysts or processes through customizing lipases or other acyltransferases and specially engineered reactions.

Graille J., Pina M., Villeneuve P.
Recent Res. Devel. Biotech. Bioeng., 4, 7-24, 2001

Lipase-catalyzed synthesis of quinate or glucuronate fatty esters.

Villeneuve P., Hills G., Bachain P., Pina M., Caro Y., Barea B., Grüning B., Guyot B., Graille J.
Eur J. Lipid Sci. Technol., 104, 394-401, 2002

Plant lipases and their applications in oils and fats modification.

Villeneuve P.
Eur. J. Lipid Sci. Technol., 105, 308-317, 2003

Synthesis of pyroglutamic acid fatty esters through lipase-catalyzed esterification with medium chains alcohols.

Villeneuve P., Barea B., Sarrazin P., Davrieux F., Boulanger R., Caro Y., Figueroa-Espinoza M., Pina M., Graille J.
Enz. Microb. Technol., 33, 79-84, 2003

Lipase activity in alcoholysis and esterification reactions of crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*).

Dhuique-Mayer C., Villarreal L., Caro Y., Ruales J., Villeneuve P., Pina M.
Oléagineux, Corps gras, Lipides, 10, 232-234, 2003

- **Manuscripts soumis à revues à comité de lecture : 6**

Toward the synthesis of pyroglutamate O-lauroyl esters: Biocatalysis versus chemical catalysis.

Villeneuve P., Barea B., Barouh N., Turon F., Figueroa-Espinoza M., Piombo G., Dhuique-Mayer C., Pina M.
Soumis à Biotech. Lett.

A comparison of lipase-catalyzed reaction versus chemical catalysis for the synthesis of phytosterols fatty esters.

Villeneuve P., Turon F., Caro Y., Barea B., Pina M., Figueroa-Espinoza M., Lago R., Graille J.
Soumis à J. Am. Oil Chem. Soc.

Effect of temperature on crude preparation of *Carica papaya* lipase activity catalyzed esterification and transesterification reactions.

Turon F., Caro Y., Villeneuve P., Pina M., Graille J.
Soumis à Biotech. Lett.

Antioxidant effect of soya lecithins on vegetable oils stability and their synergism mechanisms with natural tocopherols.

Judde A., Villeneuve P., Rossignol-Castera A., Le Guillou A.
Soumis à J. Am. Oil Chem. Soc., soumis à publication.

Selective production of medium-chain fatty acid esters from triacylglycerols via a papaya lipase-catalyzed alcoholysis reaction. Application to copra oil bioconversion and medium-chain triglycerides synthesis.

Caro Y., Turon F., Villeneuve P., Pina M., Graille J.
Soumis à Eur. J. Lipid Sci. Technol. en cours de rédaction.

Application of Babaco (*Carica pentagona*) latex lipase for enzymatic lipid modification.

Villarreal L., Xu X., Li D., Dhuique-Mayer C., Ruales J., Pina M., Villeneuve P.
Soumis à Eur. J. Lipid Sci. Technol.

- **Publications dans des revues sans comité de lecture : 3**

Lipases specificities and their potential applications in oils and fats bioconversion.

Villeneuve P., Foglia T.A.
INFORM, 8, 640-650, 1997

Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. I. Lipases: environment effects and selectivities.

Graille J., Pina M., Villeneuve P.
Agro Food Industry Hightech, July/August, 6-9, 2000

Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. I. Physico-chemical modifications of lipases and related enzymes environment effects and selectivities.

Graille J., Pina M., Villeneuve P.

Agro Food Industry Hightech, September/October, 40-43, 2000

- **Rédaction de chapitre pour ouvrage scientifique : 2**

Les dérivés de lipides acaloriques et bathicaloriques : substituts de matières grasses.

Villeneuve P.

Lipides et Corps Gras Alimentaires. Ed. J. Graille, Eds Lavoisier Paris, pp 355-377, 2003

Lipophilization of phenolic compounds by enzyme-catalyzed reactions.

Villeneuve P.

Handbook of Lipid Enzymology, Editor Xuebing Xu. Eds Marcel Dekker

- **Conférences invitées dans congrès internationaux : 3**

Interest of chiral triglycerides synthesis for fat and oil modifications.

Villeneuve P., Pina M., Graille J.

2nd National Congress of Food Chemistry, 24-26 mai 1995, Catane, Italie

Applications of lipases in oils and fats restructuring.

Villeneuve P.

Solid Phase biotechnology of proteins: Basic principles and applications, 17-21 Février 2003, Quito, Équateur

Application des lipases végétales au biofaçonnement des corps gras.

Villeneuve P.

1^{er} Congrès de Lipodominique "Diversité Moléculaire et Physiopathologies", 2-5 Septembre 2003, Paris, France

- **Communications orales avec actes publiés : 3**

Chiral synthesis of a given triglyceride to characterize lipase specificities.

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Renard G., Graille J.

OFIC 94, 5-8 septembre, 1994, Kuala Lumpur, Malaisie

The transesterification bio-process: Application to laurics and butterfat.

Graille J., Villeneuve P., Pina M., Renard G., Farines M.

World Conference on oilseed and edible processing, 6-10 Octobre 1996, Istanbul, Turquie

***Carica papaya* latex: a prospective biocatalyst for oil and fat modification.**

Villeneuve P., Foglia T.A.

88th AOCS Annual Meeting, 11-14 mai 1997, Seattle, USA

- **Communications par voie d'affiche avec actes publiés : 5**

Lipases *sn3* régiosélectives ou lipases typosélectives des acides gras courts? Nouvelle approche pour lever l'ambiguïté avec des triglycérides chiraux de synthèse.

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J.

Journées Chevreul et Colloque GERLI, 19-20 octobre 1994, Marseille

Substrate specificity of microbial lipases.

Villeneuve P., Pina M., Graille J., Husmann H., Werner H., Jaeger K.E.

International Workshop, Lipases in the Biocatalysis, 11-13 avril 1996, Rome, Italie

Lipase-catalyzed esterification of glycerol with diacids : a comparative study.

Villeneuve P., Nunez A., Pina M., Graille J., Foglia T.A.

Lipases and Lipids: structure, specificity and applications in biocatalysis, 17-20 septembre 1997, Como, Italie

Lipase-catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters.

Barea B., Villeneuve P., Hill G., Pina M., Figueroa M., Guyot B., Gruning B., Graille J.

Euro Fed Lipid, 2nd Congress "Managing Oils and fats supplies for human needs." 6-8 Novembre 2002, Strasbourg, France

Transformation of coffee chlorogenic acids into multi-functional molecules.

Figueroa-Espinoza M.C., Sarrazin P., Barouh N., Villeneuve P., Guyot B., Pina M.

25th World Congress and Exhibition of the ISF "The research and Development Challenge: how to improve uses of oils and fats", 12-15 Octobre 2003, Bordeaux, France

- **Synthèse de rapports de recherches partenariat industriels/laboratoires publics: 6**

Enzyme catalyzed N-acylation of amino acids.

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 1997

Modification enzymatique d'une huile acide par des acides aminés.

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 1997

Enzyme -catalyzed synthesis of sugar acids fatty esters.

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 1998

Étude de l'effet d'extraits de fruits rouges sur l'oxydation des matières grasses.

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 2002

Prévention de l'oxydation des matières grasses dans les produits céréaliers de cuisson.

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 2001

Production d'acides linoléiques conjugués (CLA).

Villeneuve P.

Rapport confidentiel, 2003

F - ENCADREMENT DE TRAVAUX DE RECHERCHE

- **Encadrement de stagiaires (BAC +2)**

1. Mlle Florence Blanc. Deux mois, stage d'IUT Chimie Montpellier (1994).
« *Synthèse de triglycérides modèles* »
2. Mlle Florence Barraquet. Deux mois, stage d'IUT Chimie Montpellier (2001).
« *Évaluation de l'état d'oxydation des matières grasses : Comparaison de deux méthodes de mesure d'indice de peroxydes* »
3. Mlle Julie Allombert-Blaise. Deux mois, stage d'IUT Chimie Montpellier (2003).
« *Production d'acides linoléiques conjugués* »

- **Encadrement de stagiaires de DESS**

4. Stéphane Durand. Six mois. DESS Nutrition et Alimentation dans les pays en Développement, Université Montpellier II. (1994).
« *Synthèse stéréospécifique de triglycérides chiraux mixtes* »
5. Philippe Bachain. Six mois. DESS Nutrition et Alimentation dans les pays en Développement, Université Montpellier II. (1998).
« *Synthèse biocatalysée d'esters gras d'acides uroniques* »
6. Rémy Escoffier. Six mois DESS Biologie et Biotechnologie Université Aix-Marseille III. (2002).
« *Estérification biocatalysée des phytostérols par des acides gras polyinsaturés* »
7. Laurent Goujard. Six mois DESS Biologie et Biotechnologie Université Aix-Marseille III. (2003).
« *Synthèse enzymatique de triglycérides structurés enrichis en acides linoléiques conjugués.* »

- **Encadrement de stagiaires de maîtrise**

8. Mlle Mélanie Jacquin. Deux mois. Maîtrise de Chimie Université Montpellier II (1997).
« *Synthèse enzymatique de Lipo-amino acides* ».

- **Encadrement de stagiaire quatrième année Universitaire Etats-Unis.**

9. Mlle Amanda Skarbek. Douze mois. Penn State University (Philadelphia, USA).
« *Enzymatic synthesis of low calories fats* ».

- **Encadrement de projets de fin d'études d'élèves ingénieurs**

10. Mlle Blandine Chemouni. Cinq mois, Projet 3^{ème} année, ENSC Montpellier (2003).
« Obtention de lipo amino acides par voie enzymatique pour utilisation en cosmétique, pharmacie et agro-alimentaire. »

- **Co-Encadrement de stagiaire en Thèse de Master of Sciences ENSIA-SIARC**

11. Mr Alioune Badara Sall. Huit mois. Master of Science en génie agroalimentaire méditerranéen et tropical.
« Mise en place d'un protocole de synthèse de l'acide chlorogénique. »

- **Co-encadrement de thèse de Doctorat**

12. Yanis Caro. INPT.
« Valorisation de la papaine et de la bromélaïne : applications au biofaçonnement des produits alimentaires ». Soutenue le 07 septembre 2001.
13. Fabrice Turon. INPT.
« Amélioration de la qualité nutritionnelle d'une huile de thon : Biofaçonnement par une enzyme végétale naturellement supportée ». Soutenue le 23 Avril 2002.

G - AUTRES ACTIVITÉS

- Referee de publications pour les revues internationales : « Journal of the American Oil Chemists Society », « Lipids », « Enzyme and Microbial Technology », « Journal of molecular Catalysis : B Enzymatic », « European Journal of Lipids Science and Technology »
- Expertise de projets du Pôle Environnement Aquitain (PEA)
- Expertise de projets Pôle de Transfert Innovation Agro-alimentaire (TRIAL)
- Membre du Comité Scientifique de l'Institut des Corps Gras (ITERG)
- Team leader, Rex NUTRILIPID, 6^{ème} PCRDT
- Membre du Comité Scientifique Congrès International Society for Fat Research (ISF) Bordeaux 2003

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE BIOFAÇONNEMENT DES HUILES ET CORPS GRAS À L'AIDE DE LIPASES VÉGÉTALES

I - Introduction

La mise en œuvre d'enzymes dans divers procédés des industries agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique ou textile représente un marché global en perpétuelle augmentation depuis le début des années 80. Sa croissance moyenne est d'environ 8% par an. A titre d'exemple, en 1992, date à laquelle j'ai débuté mes travaux de thèse, le total des ventes mondiales d'enzymes représentait environ 500 millions d'Euros. Pour 2004, on estime que ce chiffre atteindra 1,7 milliard.

Ces protéines à activité catalytique sont attractives notamment en raison de leurs spécificités d'action très pointues, qui permettent donc de catalyser une réaction de manière beaucoup plus sélective que les catalyseurs chimiques classiques. Par conséquent, l'utilisation d'enzymes favorise la conception de procédés innovants et l'obtention de nouveaux produits. Ainsi, malgré leur coût généralement supérieur, leur emploi est indéniablement avantageux par rapport à de nombreux procédés chimiques usuels. De plus, dans bien des cas, la mise en œuvre d'enzymes permet généralement de travailler dans des conditions plus respectueuses de l'environnement et donc moins polluantes.

Les secteurs industriels pour lesquels des enzymes sont employées sont nombreux. Citons par exemple, l'industrie des détergents, celles des textiles, de l'amidon et des produits laitiers ou encore la boulangerie, l'industrie brassicole, les jus de fruits et arômes, la papeterie et enfin la chimie fine pharmaceutique. Concernant la nature des enzymes utilisées, les hydrolases représentent la grande majorité avec près de 95%. Parmi ces dernières, les protéases comptent pour environ 60% à 70%, les carbohydrases pour près de 25% tandis que les lipases (Triacylglycérol Hydrolases E.C. 3.1.1.3) ne représentent que 5 à 10%. Ces dernières sont principalement utilisées en tant qu'additifs dans la formulation de détergents, en tant que biocatalyseurs dans la production d'arômes ou dans des opérations de chimie fine (notamment pour la résolution de mélanges racémiques) et enfin dans le biofaçonnement des corps gras.

On qualifie de « biofaçonnement », l'utilisation de lipases (ou enzymes lipolytiques) en tant que biocatalyseurs pour modifier la composition et distribution en acides gras d'un corps gras en vue d'en améliorer les propriétés nutritionnelles et/ou rhéologiques. Cette technologie s'est développée à partir du milieu des années 80 et depuis connaît un essor considérable comme en témoigne le nombre de publications sur le sujet en croissance constante depuis presque vingt ans désormais (Figure 1). Le nombre de brevets industriels sur le sujet est aussi de plus en plus important et, à ce jour, il existe quelques produits commerciaux correspondant à des triacylglycérols restructurés obtenus par des technologies enzymatiques. Citons par exemple la SalatrimTM, un substitut de matière grasse à faible calorie commercialisé par la société Nabisco aux Etats-Unis et obtenu par interestérification enzymatique d'huile de colza ou soja hydrogénée avec des triacylglycérols à chaînes courtes tels que triacétine ou tributyrine. De même, la société Loders-Croklaan, filiale d'Unilever aux Etats-Unis, commercialise le BetapolTM (substitut de lait maternel), le MarinolTM ou le ClarinolTM, des huiles respectivement enrichies en acides gras poly-insaturés oméga 3 (DHA et EPA) ou en acides linoléiques conjugués (CLA) et qui sont utilisées en tant que compléments alimentaires.

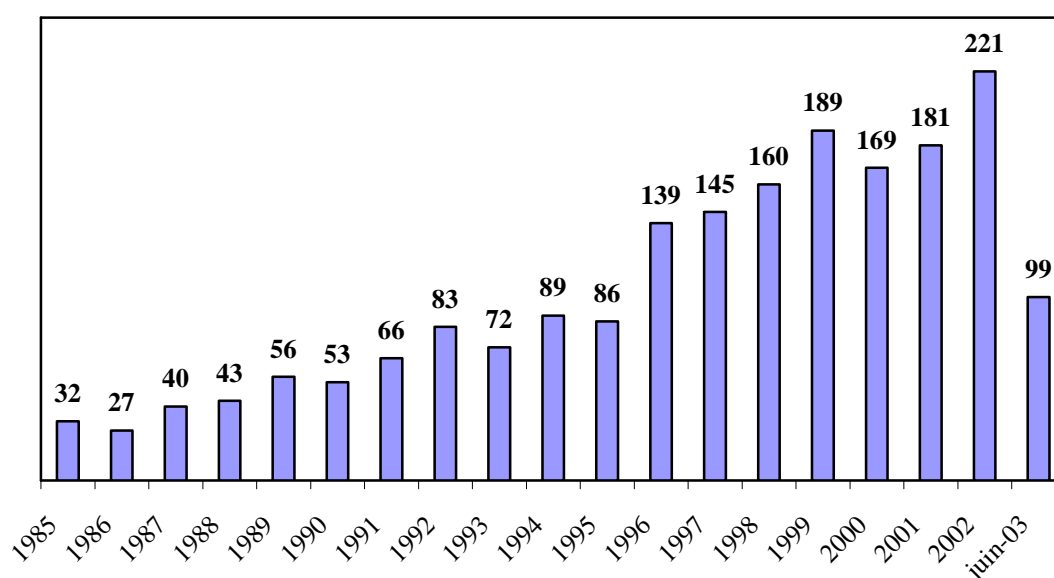


Figure 1 : Bilan des publications (hors Brevet) parues entre janvier 1985 et juin 2003 et portant sur l'utilisation des lipases dans des opérations de biofaçonnement des corps gras.

En effet, il est vite apparu que l'utilisation de biocatalyseurs lipasiques présentait des avantages indéniables par rapport à l'usage de catalyseurs chimiques classiques tels que ceux couramment employés dans les opérations de la chimie des corps gras. Outre le fait que les lipases permettent d'opérer dans des conditions de températures et de pressions plus douces, les réactions enzymatiques sont plus lentes, donc mieux contrôlables d'un point de vue cinétique, et beaucoup moins polluantes que celles réalisées avec des catalyseurs chimiques classiques. De plus, leurs spécificités d'action qui seront décrites plus en avant dans ce chapitre, permettent l'obtention de nouveaux corps gras aux propriétés nutritionnelles et/ou rhéologiques prédéfinies. On sait en effet que ces propriétés sont déterminées non seulement par la composition en acides gras du corps gras considéré mais également par la réiodistribution de ces mêmes acides gras sur le squelette triglycéridique. Sur un plan rhéologique, un corps gras est liquide (huile) ou solide (graisse) à température ambiante en fonction de la nature et de la place occupée par les acides gras sur les différentes positions du glycérol. Sur un plan nutritionnel, les acides gras en position centrale sur le glycérol n'ont pas le même devenir après digestion pancréatique. En effet, ceux situés en positions externes des triacylglycérols sont hydrolysés préférentiellement, et peuvent être éliminés par l'organisme lorsqu'ils forment avec le calcium intestinal des sels insolubles. En revanche, les acides gras en position centrale de la molécule sont préférentiellement et efficacement absorbés au travers de la paroi intestinale, sous forme de β -monoacylglycérols.

II - Spécificités d'action des lipases

Les triesters de glycérol et d'acides dénommés triacylglycérols (TAG) ou encore triglycérides, sont les substrats naturels des lipases. Ainsi, ces enzymes agissent sur les TAG en libérant des acides gras libres (AGL), ainsi que des diacylglycérols (DAG) et des monoacylglycérols (MAG).

Ces substrats triglycéridiques sont insolubles dans l'eau. L'enzyme, quant à elle, agit en milieu aqueux. Ce paradoxe confère à la lipolyse un caractère tout à fait particulier. En effet, elle se produit à l'interface lipide/eau. Ce substrat lipidique s'organise spontanément au contact de l'eau, principalement sous forme de films monomoléculaires, de feuilletts multimoléculaires, d'émulsions ou de micelles [Verger et Rivière, 1987]. Cette organisation particulière de la matière lipidique à l'interface rend possible la catalyse par la lipase. Ce phénomène interfacial est propre à la lipolyse enzymatique.

Les lipases comportent dans leur structure spatiale une zone hydrophobe au niveau du site actif, ce qui leur permet de s'adsorber au niveau de l'interface eau/lipide et d'augmenter la vitesse de la réaction (Verger & Rivière, 1987). Il s'agit d'enzymes à sérine dont le site actif est composé d'une triade catalytique constituée de trois acides aminés : la sérine, l'histidine et l'acide aspartique. Dans certains cas, l'acide aspartique peut être remplacé par l'acide glutamique comme par exemple pour la lipase de *Geotrichum candidum*.

De plus, la détermination des structures tertiaires de diverses lipases a montré l'existence d'un volet qui recouvre le site actif. Ce volet, placé au-dessus du site catalytique peut être comparé à un long couvercle stabilisé par des interactions hydrophobes et électrostatiques. Durant la lipolyse enzymatique, ces interactions vont être progressivement modifiées, induisant ainsi la réorientation du volet recouvrant le site actif de la lipase. L'ouverture de ce volet va ainsi permettre le rapprochement du substrat et de la triade catalytique. La lipolyse enzymatique se poursuit par la formation d'un complexe enzyme-substrat. Le groupement acyle d'un TAG est transféré sur le site actif de la lipase, au niveau de l'hydroxyle du résidu sérine. Lors d'une seconde étape, cet intermédiaire réactionnel subit une attaque nucléophile de la molécule d'eau, engendrant la libération d'un AG et la régénération de l'enzyme.

Pour définir la spécificité d'action des lipases lors de la lipolyse des triglycérides, il faut avoir à l'esprit que les triacylglycérols sont des molécules prochirales pour lesquelles une nomenclature propre à la chimie des lipides (stereo numbered nomenclature) permet de distinguer les positions *sn1*, *sn2* et *sn3* du squelette triglycéridique en fonction de la configuration du carbone asymétrique représenté en projection de Fisher (Figure 2).

Dès lors, ces spécificités d'action des lipases, qui se traduisent par des différences au niveau des vitesses de réaction, peuvent être classées en plusieurs groupes.

Spécificité de substrat : Les substrats naturels des lipases sont les esters de glycérol. Par conséquent ces enzymes sont non seulement capables de catalyser l'hydrolyse des triesters (triacylglycérols) mais également celle de glycérides partiels (diacylglycérols, monoacylglycérols) et même celle des phospholipides pour le cas des phospholipases. Ainsi, la spécificité de substrat est définie comme la capacité de la lipase à hydrolyser préférentiellement un type d'esters de glycérol. En règle générale, les TAG sont les substrats préférentiels de la grande majorité des lipases. Au contraire, les MAG sont bien souvent des

substrats sur lesquels l'activité des lipases est réduite. Cependant, quelques lipases sont connues pour leur spécificité de substrats très particulière. Citons, par exemple celle de *Penicillium camembertii* qui est décrite comme étant strictement spécifique des DAG et qui ne montre pas d'activité sur les TAG.

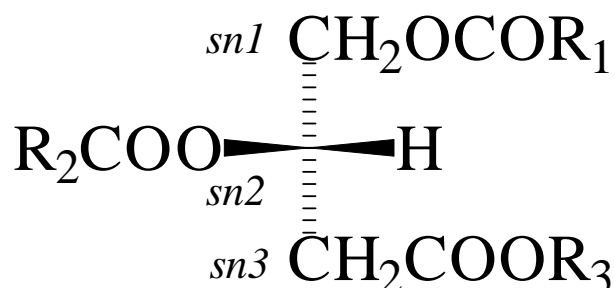


Figure 2 : Représentation et nomenclature *sn* d'un triacylgcérol

Les autres types de spécificités sont directement liés à l'hydrolyse de substrats triglycéridiques.

Spécificité de position ou régiosélectivité : Des lipases sont dites régiosélectives lorsqu'elles sont capables de distinguer les positions externes du squelette triglycéridique de la position centrale. Par conséquent, lors de la lipolyse d'un TAG, une lipase 1,3 régiosélective hydrolysera préférentiellement les positions *sn1* et *sn3* (esters primaires) au dépend de la position centrale *sn2*. Un mélange équimolaire de DAG 1,2 et DAG 2,3 est obtenu qui conduit alors à la formation de β monoacylglycérols. La lipase pancréatique de porc exprime ce type de spécificité. Il en est de même pour de nombreuses lipases microbiennes telles que celles de *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* ou *Rhizopus arrhizus*. A notre connaissance, à ce jour, aucune lipase exprimant une *sn2* régiosélectivité n'a été identifiée.

Typosélectivité ou acyl sélectivité : les lipases peuvent également être spécifiques d'un acide gras donné ou plus généralement d'une famille d'acides gras donnée. Par conséquent, elles hydrolyseront préférentiellement cet acide gras ou cette famille quelle que soit sa position sur le squelette triglycéridique. Ainsi, la lipase de *Geotrichum candidum* est très spécifique des acides gras présentant une double liaison *cis* en 9. De nombreuses lipases d'origines diverses sont spécifiques des acides gras à chaînes courtes comme par exemple de nombreuses lipases gastriques de mammifères ou encore celle de *Penicillium roqueforti*.

Stéréospécificité : Cette spécificité décrit la capacité de certaines lipases à distinguer les positions *sn1* et *sn3*. Ainsi, les lipases de *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas fluorescens* seraient *sn1* stéréospécifiques tandis que celle de *Candida antarctica* B, ou la cutinase lipase de *fusarium solani* présentent une préférence marquée pour la position *sn3*.

Absence de spécificité ou non sélectivité : Certaines lipases ne montrent absolument aucune sélectivité ou spécificité. On parle alors d'enzymes non sélectives. Elles hydrolyseront donc n'importe lesquelles des positions du substrat triglycéridique et ce sans distinction aucune quant à la nature des acides gras présents sur le squelette triglycéridique. Des exemples de telles lipases concernent *Penicillium expansum*, *Aspergillus* sp. ou encore *Candida rugosa* (anciennement nommée *candida cylindracea*).

*(Les spécificités d'action des lipases ainsi que les méthodes pour les mettre en évidence ont été décrites plus en détails dans un de mes articles de revue : **Lipases specificities: potential application in lipid bioconversions.** Villeneuve P., Foglia T.A., INFORM, 8, 640-650, 1997. Article référencé n°7.)*

III - Méthodes de détermination des spécificités des lipases

Afin de pouvoir sélectionner la lipase que l'on souhaite mettre en œuvre pour le biofaçonnement recherché, il est nécessaire de disposer d'une méthode fiable permettant de caractériser précisément la spécificité d'action de l'enzyme concernée.

Plusieurs méthodes de détermination existent et dépendent notamment du type de spécificité que l'on veut mettre en évidence. De plus, il faut comprendre que la caractérisation des spécificités doit être effectuée en conditions d'hydrolyse limitée afin d'éviter les difficultés d'interprétation des résultats liées aux phénomènes de migrations d'acyle ou à l'attaque par les lipases des produits de la réaction de lipolyse.

III - 1 Hydrolyse de Triacylglycérols homogènes

Les triglycérides homogènes, c'est à dire constitués d'un seul et même acide gras, sont souvent utilisés pour déterminer des typosélectivités en comparant les cinétiques des réactions d'hydrolyses enzymatiques effectuées avec la même lipase sur des substrats triglycéridiques variant seulement par la nature de leur acide gras (longueur de chaîne, nombre et

configuration des doubles liaisons). De nombreuses lipases végétales ont été testées suivant ce protocole puisque celles-ci présentent souvent une typosélectivité marquée pour l'acide gras majoritairement présent dans la plante dont elles sont issues. C'est ainsi qu'il a été démontré que la lipase *Vernonia galamensis* possédait une sélectivité pour l'acide vernolique (Ncube *et al*, 1995), que celle issue du ricin (*Ricinus communis*) hydrolysait préférentiellement l'acide ricinoléique ou encore que la lipase du maïs était typosélective pour l'acide linoléique (Lin *et al*, 1986). De même, Giordani *et al.* (1991) ont étudié la lipase du latex de *Carica papaya* et montré que celle-ci exprimait sa plus forte activité sur les TAG à chaînes courtes et en particulier la tributyrine.

Ces méthodes impliquant des substrats homogènes sont en général efficaces pour bien caractériser les typosélectivités. Cependant, elles présentent des inconvénients. En effet, la spécificité d'une réaction de lipolyse enzymatique n'est pas seulement due au biocatalyseur utilisé mais également au substrat et plus particulièrement à la structure de l'interface huile/eau. Ainsi, une hydrolyse plus rapide sur la tributyrine par rapport à la trioléine ou la tripalmitine n'est pas forcément la conséquence d'une typosélectivité de la lipase pour l'acide butyrique mais peut être aussi attribuée à une différence fondamentale au niveau des émulsions, micelles ou films formés par ces différents TAG homogènes. De plus, ces derniers ont des points de fusions très différents dépendant de la nature de la chaîne aliphatique de l'acide gras constitutif. Ainsi, des TAG à longues chaînes saturées seront concrets à des températures pour lesquelles les TAG homogènes à chaînes courtes ou moyennes seront liquides. Or on sait que les TAG à l'état cristallin seront plus lentement hydrolysés par une lipase qu'à l'état liquide. Par conséquent, pour ce type de méthode de détermination des spécificités lipasiques il est absolument primordial d'opérer sous des conditions pour lesquelles tous les substrats homogènes testés sont dans le même état physique avec une organisation à l'interface rigoureusement identique. Souvent, cette difficulté est détournée en utilisant non pas des TAG mais plutôt des esters alkyliques (méthyliques ou éthyliques) lesquels sont tous liquides aux températures usuelles d'expérimentation ($35^{\circ}\text{C} < t < 60^{\circ}\text{C}$). Dans ce cas, deux stratégies peuvent être employées : soit l'hydrolyse des esters ou soit l'estérification d'acides gras libres par des alcools puisque les lipases sont en mesure de catalyser les réactions inverses aux hydrolyses.

Les TAG homogènes peuvent être également employés pour mettre en évidence des spécificités de position en comparant les cinétique de formation des DAG 1,2 et 2,3 formés au

cours de la lipolyse Ainsi, Ota *et al* (1996) ont hydrolysé la trioléine par différentes lipases et utilisé les techniques d'HPLC chirale pour séparer et quantifier les différents DAG énantiomères formés. Mais une des méthodes les plus pertinentes utilisant des substrats homogènes reste celle développée par l'équipe du Pr. Verger à Marseille (Rogalska *et al.*, 1990, 1993) dans laquelle la prochiralité de telles molécules est mise à profit. En effet, les deux positions externes d'un TAG homogène sont stéréochimiquement non équivalentes et certaines des lipases testées pourront donc distinguer les positions *sn1* et *sn3*. Ce groupe de recherche a travaillé sur la trioctanoïne et la trioléine et quantifié la formation des différents DG énantiomères formés par HPLC après dérivatisation en carbamates diastéréoisomères. De nombreuses lipases animales ou microbiennes ont pu être ainsi caractérisées.

III - 2 Hydrolyse d'analogues de triacylglycérols

La difficulté majeure à surmonter lorsque l'on utilise des substrats triglycéridiques naturels pour déterminer les spécificités d'action des lipases est d'éviter tout phénomène de migration d'acyle intramoléculaire. En effet, si une telle migration a lieu, il est alors impossible de caractériser la spécificité effective de l'enzyme étudiée. Il peut alors apparaître intéressant d'utiliser des analogues de TAG pour lesquels toute migration d'acyle est limitée voir impossible. Ainsi, Ransac *et al.* (1990) ont synthétisé des énantiomères 1(3)-alkyl 2,3 (1,2)-diacyl *sn* glycérol, 1(3)-alkyl 2-acyl *sn* glycérol et 1(3)-acyl-alkyl 2-acylamino 2-deoxy *sn* glycérol pour les utiliser en tant que substrats dans l'évaluation de stéréospécificité de lipases gastriques et pancréatiques (Figure 3). De même, Mannese *et al.* (60) ont évalué le comportement de la cutinase de *Fusarium solani pisi* en hydrolyse de triglycérides analogues pour lesquels une fonction acyle est remplacée par une fonction alkyle et où la position *sn2* correspond à une fonction acyl amino.

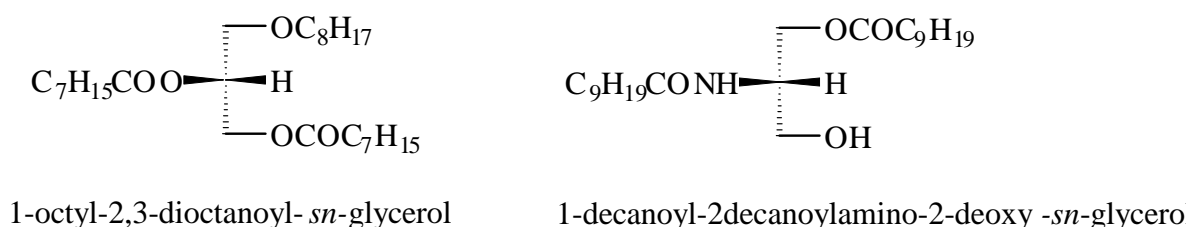
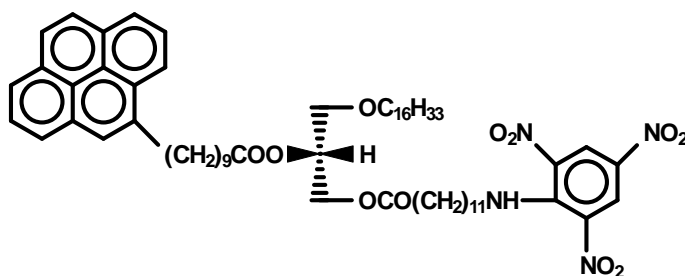


Figure 3 : Analogues de TAG utilisés par Ransac *et al* (1990)

De tels substrats ne contiennent alors qu'une seule liaison potentiellement hydrolysable sous l'action d'une lipase. Les deux énantiomères sont mis en oeuvre pour étudier l'influence de la longueur de chaîne en positions *sn* 1, 2 et 3 sur l'activité de la lipase et sa stéréospécificité. Enfin, citons Zandonella *et al.* (1995) qui ont synthétisé des énantiomères 1-O alkyl 2,3- diacyl *sn* glycérol et 3-O alkyl 1,2-diacyl *sn* glycérol contenant des résidus pyrène et trinitrophenylamino comme marqueurs fluorescents chacun situé sur la chaîne acylée en positions *sn*2 et *sn*1 (3) (Figure 4). Durant la lipolyse enzymatique, la cinétique de la réaction peut être évaluée par l'augmentation de l'intensité de la fluorescence. Ces deux énantiomères ont été alors employés pour tester les lipases de *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas* sp. et *rhizopus arrhizus*.



R)-3-trinitrophenylaminolauroyl-2-pyrenedecanoyl-1-O-hexadecyl- *sn*-glycerol

Figure 4 : Analogues de TAG utilisés par Zandonella *et al* (1995)

Bien que ces analogues de TAG permettent l'élimination de tout phénomène de migration d'acyle, ils présentent l'inconvénient de ne pas être de véritables substrats naturels des lipases et par conséquent subsiste toujours un doute quant au comportement réel qu'aurait la lipase sur de véritables TAG.

III - 3 Hydrolyse de TAG de synthèse

Quelques méthodes de détermination des spécificités lipasiques sont basées sur l'utilisation de TAG hétérogènes de synthèse. Bien que la synthèse de ce type de substrats soit difficile, ils constituent un outil efficace pour mettre en évidence les modes d'action des lipases testées puisque leur composition en acides gras ainsi que la distribution de ces derniers sur le squelette triglycéridique sont parfaitement connus. Ainsi, Sonnet et Gazzillo (1991) ont utilisé un mélange racémique de triglycérides mixtes, en l'occurrence les 1(3)-palmitoyl 2-oléoyl 3(1)-stéaroyl *rac* glycérol pour évaluer la spécificité de multiples lipases commerciales.

De même citons les récents travaux d'un groupe de recherche d'Unilever (Chandler *et al*, 2001) qui a synthétisé un substrat triglycéridique marqué au deuterium (trioléine deutérée). Après son hydrolyse enzymatique, les produits de la réaction sont alors analysés par RMN ^{13}C et en raison du marquage isotopique, il est alors possible de différencier les DAG 1,2 des 2,3. Ainsi il a été possible de mettre en évidence les stéréospécificités des lipases de *Mucor miehei*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa* et *Carica papaya*.

IV - Travaux de Thèse : Mise au point d'une méthode de détermination de spécificités lipasiques

Nous avons vu précédemment que les méthodes destinées à caractériser les spécificités des lipases sont variées mais présentent pour certaines des inconvénients. Celles impliquant des substrats triglycéridiques de synthèse apparaissent avantageuses. En effet, bien que l'obtention de tels substrats soit difficile, les résultats obtenus éliminent toute indétermination relative à l'influence de la composition et de la répartition en acides gras d'un substrat naturel.

Nous avons imaginé une méthode de détermination consistant à hydrolyser conjointement un triglycéride chiral mixte (constitué de trois acides gras différents) et son équivalent racémique. Par cette approche, l'analyse des produits réactionnels obtenus en début de réaction (taux de lipolyse < 10%), permet de déterminer avec beaucoup moins d'ambiguïté tous les types de sélectivités d'action des biocatalyseurs mis en œuvre : non sélective, typosélectivité, régiosélectivité, stéréosélectivité, combinaison de deux sélectivités.

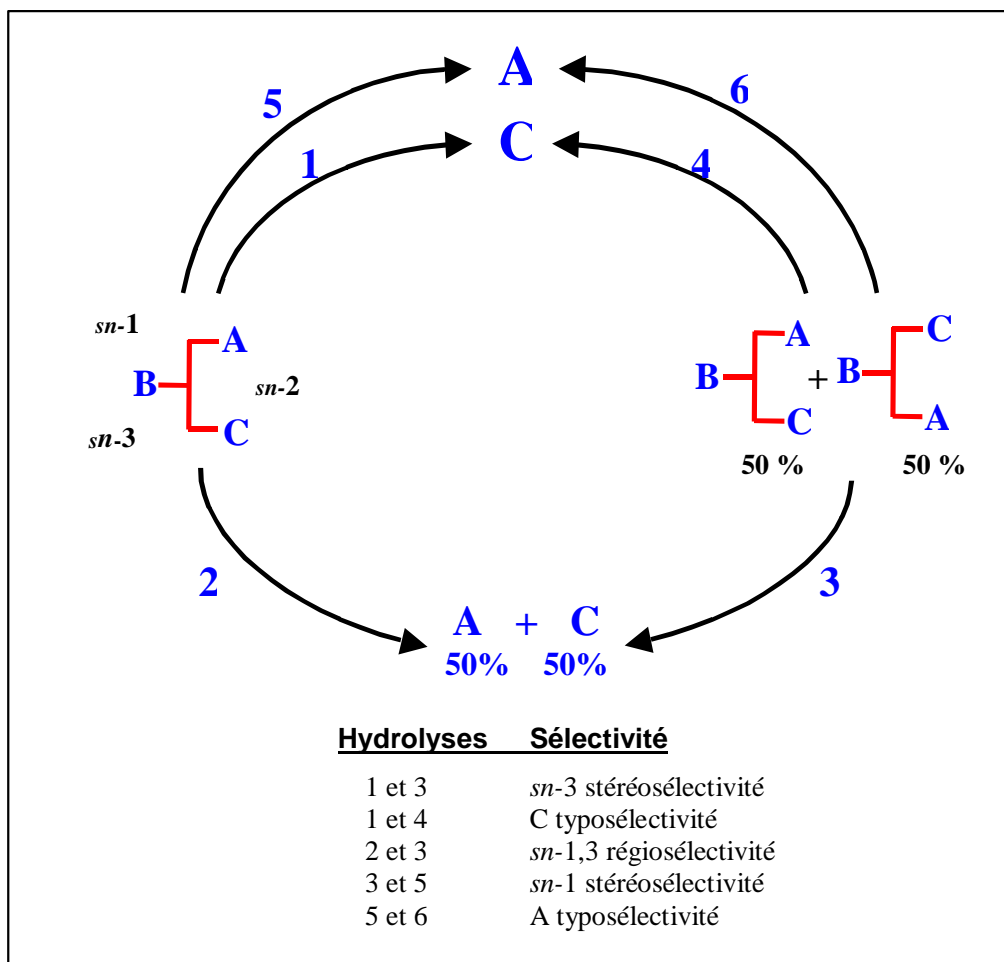


Figure 5 : Stratégie de mise en évidence des sélectivités des lipases en hydrolyse

Le principe de la méthode est le suivant (Figure 5) : nous procédons dans un premier temps à l'hydrolyse enzymatique du substrat chiral, dont les résultats seuls nous conduisent généralement à deux hypothèses possibles quant à la spécificité de l'enzyme mais ne nous permettent pas encore de conclure. En effet, sur le substrat chiral de type 1-A 2-B 3-C *sn* glycérol, si l'hydrolyse montre une libération d'acide C, il est impossible de déterminer si la lipase est C typosélective ou stéréospécifique de la position *sn*3 en raison de la position de cet acide sur la position *sn*3. C'est dans un second temps que l'hydrolyse du triglycéride racémique permet en fait d'opter pour l'une des deux hypothèses formulées. En effet, ce substrat correspond à un mélange en proportions strictement égales de 1-A 2-B 3-C *sn* glycérol et 1-C 2-B 3-A *sn* glycérol. De ce fait, si l'hydrolyse du mélange racémique libère préférentiellement l'acide C, nous concluons à une C typosélectivité de l'enzyme ; si au contraire la lipase libère dans des proportions globalement équivalentes les acides A et C, cela

signifie que la lipase manifeste une *sn3* stéréospécificité, puisque cette position est occupée par les acides A et C.

Dans ce contexte, la synthèse d'un TAG chiral renfermant un AG court en *sn-1* et un AG long en *sn-3*, à savoir le 1-Butyroyl-2-Oleoyl-3-Palmitoyl *sn* glycérol (BOP), peut permettre de lever l'ambiguïté récurrente en hydrolyse entre typosélectivité pour les chaînes courtes et *sn3* stéréospécificité des lipases. En effet, bon nombre de déterminations de spécificités lipasiques ont été effectuées sur la matière grasse laitière. Cette matière grasse est riche en acides gras courts et présente une certaine asymétrie puisque la grande majorité de ces acides gras est localisée en position *sn3* du squelette triglycéridique. Ainsi, si les résultats obtenus montrent une libération préférentielle des acides courts lors d'une hydrolyse enzymatique de la matière grasse laitière, il est impossible de savoir si cette libération provient d'une typosélectivité réelle vis à vis des acides gras à chaînes courtes ou d'une *sn3* stéréospécificité. Ainsi les TAG que nous avons synthétisés sont uniques et non rencontrés dans la nature puisqu'ils possèdent un acide gras court (acide butyrique) non pas en position *sn3* mais en position *sn1*. De tels substrats, nous le verrons plus en avant dans ce chapitre, nous ont permis notamment de démontrer que l'activité lipasique du latex de *Carica papaya* exprimait en fait une *sn3* stéréospécificité bien plus marquée que ne peut l'être sa préférence pour l'hydrolyse des acides gras courts.

La première partie du travail a donc consisté à synthétiser par voie chimique les substrats modèles souhaités. La procédure de synthèse chimique asymétrique permettant l'obtention des substrats désirés est décrite ci-après.

IV - 1 Synthèse chirale des substrats triglycéridiques hétérogènes

(Cette synthèse chimique asymétrique a fait l'objet d'une publication : **Chiral synthesis of a triglyceride: example of 1-butyroyl 2-oleoyl 3-palmitoyl *sn* glycerol**. Villeneuve P., Pina M., Montet D., Renard G., Graille J., Chem. Phys. Lipids, 72, 135-141, 1994. Article référencé n°1.)

La méthode proposée de détermination des spécificités lipasiques n'a de sens que si les triglycérides substrats utilisés sont parfaitement définis sur les trois positions du glycérol. En effet, il est absolument impératif d'obtenir des triglycérides du type 1-A 2-B 3C *sn* glycérol (où A, B et C représentent trois acides gras différents) de pureté élevée, pureté que

nous avons choisie au préalable de fixer arbitrairement à une valeur minimale de 95%. En effet, la mise en œuvre de substrats insuffisamment purs dans notre méthode de détermination des spécificités lipasiques suivant le principe décrit en figure 5 conduirait inévitablement à des interprétations erronées.

A l'époque de nos travaux sur la mise au point de la synthèse des substrats chiraux, les synthèses chimiques de triglycérides mixtes étaient longues et fastidieuses. La plupart d'entre elles étaient basées sur la préparation d'énantiomères 1,2 et 2,3 d'isopropylidène *sn* glycérol. Ainsi, elles nécessitaient l'introduction de groupements protecteurs pouvant ultérieurement être éliminés de façon sélective et en principe sans isomérisation. Malheureusement, la pureté des produits est insuffisante et cette stratégie de synthèse ne permet pas d'obtenir des triglycérides parfaitement définis par rapport aux trois positions du glycérol. Par ailleurs, ont été également décrites des réactions d'estérification dirigée qui sont fonction de la plus grande réactivité des hydroxyles primaires en position *sn*1 et *sn*3, mais des phénomènes de migrations d'acyles importants sont en général observés. Quant aux synthèses enzymatiques, qui semblent plus accessibles d'un point de vue purement opérationnel, elles sont peu utilisées pour la synthèse de triglycérides mixtes et sont plutôt mises en œuvre dans l'obtention de glycérides partiels.

En raison de la grande réactivité des époxydes, sont apparues conjointement des propositions de synthèse de triglycérides à partir d'ester de glycidol. Cependant, là non plus, la plupart d'entre elles n'aboutissaient qu'à des produits finaux ne présentant pas une pureté suffisante pour être utilisés dans notre méthode de détermination. Seule une méthode décrite par Sonnet (1991) semblait permettre la synthèse de TAG de haute pureté. L'étape la plus importante de cette synthèse correspondait à l'ouverture régiosélective du pont époxy d'un énantiomère du glycidyl butyrate formant un produit intermédiaire de type bromodiacyl glycérol lequel subissait ensuite une substitution nucléophile pour remplacer le brome par un carboxylate. Malheureusement, bien qu'ayant suivi à la lettre le mode opératoire décrit, il ne nous a jamais été possible d'obtenir des TAG mixtes avec des puretés équivalentes à celles mentionnées dans cette publication. Nous avons observé notamment d'importants phénomènes d'isomérisation se produisant probablement lors de l'ouverture de l'époxyde ou au cours des étapes d'extraction et purification des produits.

Nous avons donc adapté la méthode de Sonnet en retravaillant son protocole opératoire (élimination de tout lavage basique de manière à ne pas favoriser les migrations d'acyles) mais surtout en modifiant significativement l'étape d'ouverture du pont époxy du glycidyl butyrate. Notamment, nous avons vu que les catalyseurs de type ammonium quaternaire pouvaient être avantageux pour diriger et améliorer la régiosélectivité de cette étape (Jin, 1993). Nous avons pu dès lors montrer que l'utilisation d'un tel catalyseur permettait par un mécanisme d'assistance anchimérique (Plenat *et al*, 1980) d'obtenir une ouverture de l'époxyde hautement sélective (Figure 6). Ainsi, si l'on part d'un glycidyl butyrate chiral de configuration R, le bromure de benzyltributylammonium (Q^+Br^-) permet d'obtenir un 1,2-acyl bromo glycérol où l'atome de brome est placé en nomenclature *sn* sur la position *sn3* du squelette triglycéridique.

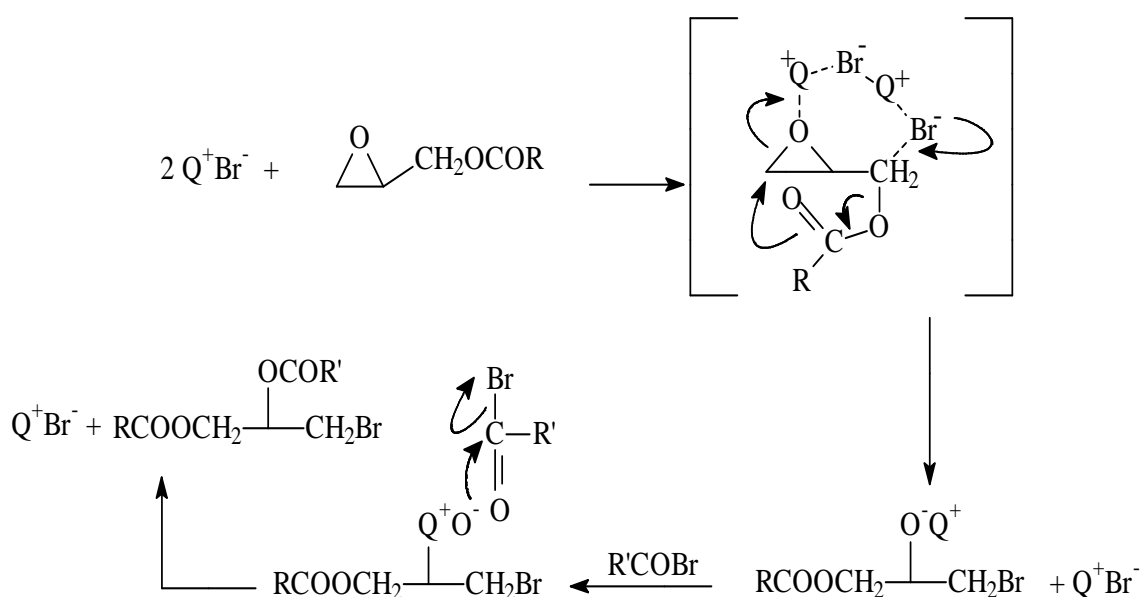


Figure 6 : Mécanisme d'ouverture de pont époxyde avec assistance anchimérique

Puis la réaction de substitution de l'atome de brome de type SN_2 , s'effectue par l'action d'un sel de césium d'un acide gras. Dans de telles conditions, compte tenu de l'encombrement important de l'ion césium, l'anion carboxylate est un bon nucléophile. En fin de réaction, en utilisant les techniques usuelles de détermination de la répartition des acides gras sur un squelette triglycéridique, nous avons validé le fait que notre synthèse permettait d'obtenir des triacylglycérols chiraux mixtes d'une pureté en adéquation avec les valeurs minimales fixées (> 95%) de manière à pouvoir utiliser ces substrats pour déterminer la spécificité d'action des lipases.

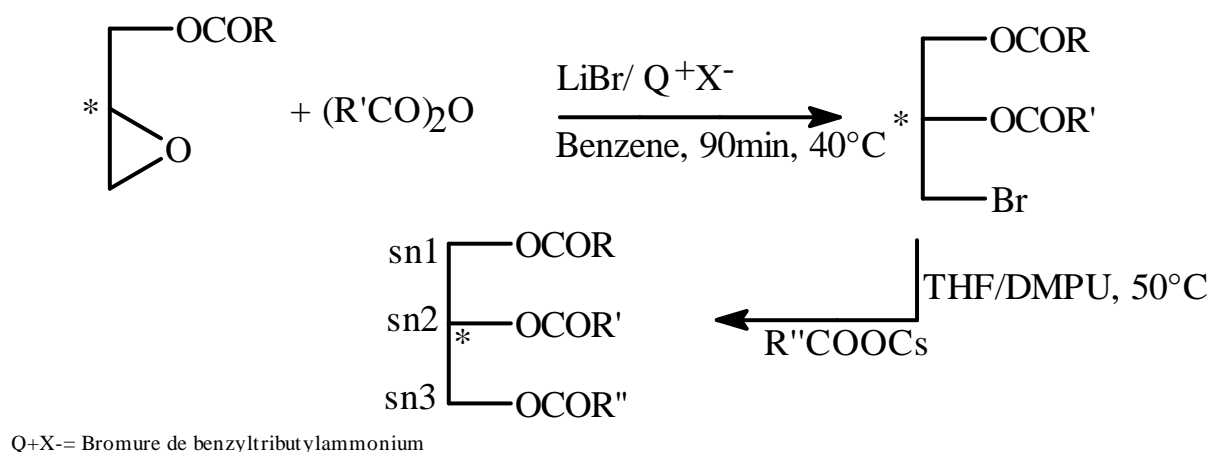


Figure 7 : Schéma de synthèse pour la production de triacylglycérols chiraux mixtes de type 1-R 2-R' 3-R'' *sn* glycérol (ou R, R' et R'' représentent trois acides gras différents)

Concernant la synthèse des équivalents racémiques, les glycidyl esters racémiques n'étant pas commercialement disponibles, il nous a fallu ajouter une étape préliminaire supplémentaire correspondant à la synthèse de ces produits à partir d'épichlorohydrine racémique. En présence d'iodure de tétraéthylammonium et d'un acide gras sous forme de sel de sodium, la réaction permet d'obtenir l'ester de glycidol désiré avec un rendement très satisfaisant (> 85%).

Pour conclure, rappelons qu'un des principaux objectifs de notre étude sur la spécificité des lipases était, à partir de notre méthode de détermination, de lever l'ambiguïté pouvant exister entre stéréosélectivité et typosélectivité pour certaines enzymes. Nous avons donc synthétisé des triglycérides chiraux dans lesquels la position *sn1* est occupée par un acide à chaîne courte en l'occurrence l'acide butyrique. Ainsi, le 1-butyroyl 2-oleoyl 3-palmitoyl *sn* glycérol a constitué l'un des principaux substrats que nous avons mis en œuvre.

IV - 2 Exemple de déterminations des spécificités d'action de différentes lipases d'origines animale, microbienne ou végétale.

(Cette partie a fait l'objet de quatre publications : **Determination of lipase specificities through the use of chiral triglycerides and their racemics**. Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J., Chem. Phys. Lipids., 76, 109-113, 1995. Article référencé n°2.

***Carica papaya* latex lipase: *sn*3 Stereoselectivity or short-chain selectivity ? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity.** Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J., J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 753-755, 1995. Article référencé n°3.

Chiral synthesis of a given triglyceride to characterise lipase specificities. Villeneuve P., Pina M., Montet D., Ozenne C., Renard G., Graille J., Malaysian Oil Science and Technology, 4, 171-174, 1995. Article référencé n°4.

Determination of pregastric lipase specificity in young ruminants. Villeneuve P., Pina M., Graille J., Chem. Phys. Lipids, 83, 161-168, 1996. Article référencé n°5.)

Une fois la voie de synthèse de nos substrats chiraux et racémiques finalisée, nous avons pu mettre en oeuvre notre méthode de détermination des spécificités lipasiques pour caractériser un nombre important de lipases d'origines animales, microbiennes ou végétales. Dans un premier temps, la méthode a été validée en testant des lipases de spécificité déjà bien connue : Ainsi nous avons pu confirmer les résultats d'autres équipes de recherche sur la lipase de *Mucor miehei* en montrant, nous aussi, que cette enzyme était strictement 1,3 régiosélective. De même, nous avons évalué le comportement de la lipase de *Candida rugosa* et conclut à une non spécificité exprimée par cette enzyme comme cela a été également observé par d'autres auteurs. Une fois la méthode validée sur des enzymes au comportement bien caractérisé, nous avons pu alors étudier des enzymes de spécificité peu ou pas encore décrites. Ainsi, par exemple, nous avons pu mettre en évidence une *sn*1 stéréospécificité pour la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (cette lipase a été étudiée dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. K.E. Jaeger, Ruhr Universitat, Allemagne), une *sn*3 stéréospécificité pour la lipase gastrique de lapin, une acides gras courts typosélectivité pour *Candida antarctica B* ou une 1,3 régiosélectivité pour *Candida parapsilosis*.

Concernant les lipases prégastriques de jeunes ruminants (veau, agneau, chevreau), nous avons montré que ces enzymes présentaient une *sn*3 stéréospécificité associée à une acides gras courts typosélectivité. Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus avec la composition et la *sn* distribution en acides gras des laits maternels de ces trois espèces a révélé des corrélations très intéressantes. Il semblerait en effet que pour les trois espèces étudiées, la lipase prégastrique a une *sn*3 stéréospécificité et typosélectivité d'autant plus forte que la concentration et distribution en position *sn*3 des acides gras courts du lait maternel est faible. L'importance de la spécificité de la lipase permettrait donc de favoriser l'assimilation métabolique des acides gras courts lesquels sont d'une très grande importance énergétique

d'un point de vue nutritionnel, compte tenu de leur plus grande rapidité d'assimilation que les acides gras à chaînes plus longues.

Enfin, à l'aide du 1-butyroyl 2-stéaroyl 3-palmitoyl *sn* glycérol et de son équivalent racémique, nous avons pu étudier avec précision la stéréospécificité de la lipase du latex de *Carica papaya*. En effet, la localisation en position *sn1* d'un acide gras à chaîne courte nous a permis de lever l'ambiguïté qui pouvait exister entre typosélectivité pour les acides gras courts et *sn3* stéréospécificité. L'hydrolyse du substrat chiral par cette lipase à un taux de lipolyse de l'ordre de 10%, a montré une forte libération d'acide palmitique (85%) alors que l'acide butyrique quant à lui ne représentait que 15%. Conjointement, nous avons observé que l'hydrolyse du substrat racémique, pour lequel chacune des positions *sn1* et *sn3* est occupée à 50% par de l'acide butyrique et 50% par du palmitique, conduisait à une libération globalement similaire des deux acides gras, l'acide gras court étant très légèrement majoritaire (55%).

De cette étude, nous avons pu rigoureusement démontrer que la lipase de *Carica papaya* exprimait une forte *sn3* stéréospécificité qui était largement prépondérante par rapport à sa typosélectivité pour les chaînes courtes.

Nous verrons plus en avant dans ce document comment les propriétés catalytiques de cette lipase végétale ont été valorisées dans des opérations de biofaçonnement des corps gras permettant d'aboutir à la production de triacylglycérols restructurés à intérêt nutritionnel.

V - Opérations du biofaçonnement des corps gras et avantages potentiels des lipases végétales

V - I Type de réactions du biofaçonnement des corps gras

Dans des conditions proches de celles de la réaction de référence qu'elles catalysent *in vivo*, les enzymes peuvent catalyser *in vitro* les mêmes réactions, souvent avec la même spécificité d'action et quelques fois avec des substrats beaucoup plus variés. De nombreuses enzymes hydrolytiques peuvent aussi, lorsque les conditions du milieu le permettent, catalyser des réactions "inverses" à celle pour laquelle elles sont "programmées" *in vivo*. Par exemple, de nombreuses lipases dans certaines conditions catalysent des réactions d'estérification (à l'inverse de la réaction d'hydrolyse) et d'interestérification. Elles agissent ainsi comme des

acyltransférases au même titre que certaines protéases qui peuvent être également employées comme biocatalyseur dans des réactions de synthèses peptidiques, en présence d'une phase aqueuse limitée.

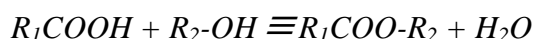
L'application de chaque enzyme pour une réaction donnée nécessite donc une connaissance parfaite des paramètres optimaux avec lesquels l'enzyme exprime ces propriétés catalytiques maximales. Cela concerne entre autres, le pH, la température, la teneur en eau, l'activité de l'eau (a_w).

Les lipases ont toujours été moins utilisées que les protéases dans l'industrie, car leurs modes d'action étaient moins bien connus. Le véritable essor de l'utilisation des lipases ne s'est produit qu'à partir des années 1970, date à laquelle le mode d'action de ces enzymes (Naudet, 1976 ; Verger et Rivière, 1987), ainsi que les méthodes analytiques à mettre en œuvre (Beisson *et al*, 2000) commençaient à être mieux maîtrisés.

Les toutes premières utilisations des lipases portaient essentiellement sur des hydrolyses de TAG en milieu aqueux. Après la mise en évidence de leurs activités catalytiques dans les réactions d'estérification et d'interestérification en solvant organique, leurs applications pour le biofaçonnement des corps gras se sont alors très rapidement développées. En effet, selon la nature du substrat et les conditions de la réaction enzymatique mise en œuvre, elles peuvent catalyser soit des réactions d'hydrolyse, soit des réactions de synthèse (estérification) ou de transfert d'acyle (interestérification).

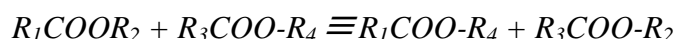
Ces réactions sont schématisées ci-après :

- Réactions d'estérification entre un AG libre et un alcool :

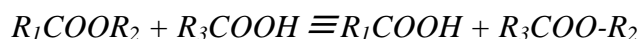


- Réactions d'interestérification (transfert d'acyle entre un TAG et un autre donneur d'acyle), lesquelles peuvent être réparties en trois sous catégories suivant la nature du donneur d'acyle :

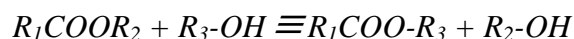
- 1- Réaction de transestérification (TAG + TAG ou ester d'AG)



- 2- Réaction d'acidolyse (TAG + AG libre)



- 3- Réaction d'alcoolyse (TAG + alcool) [ou glycérolyse lorsque l'alcool est le glycérol]



L'interestérification est l'une des réactions de transformation industrielles courantes des corps gras pour créer des produits restructurés avec de nouvelles propriétés physiques, rhéologiques et nutritionnelles. Si l'interestérification chimique et sa variante, l'interestérification dirigée à basse température, continuent à être employées depuis très longtemps dans l'industrie, actuellement les nouvelles applications ont tendance à utiliser beaucoup plus des interestérifications biocatalysées.

Les avantages de l'utilisation des lipases sélectives en interestérification enzymatique sont multiples en comparaison avec les catalyseurs chimiques classiques.

Ces avantages sont listés ci-dessous :

- 1- L'interestérification se fait dans des conditions douces de température et de pression.
- 2- Il n'est plus nécessaire de travailler sur des substrats complètement anhydres, ni d'utiliser un solvant organique.
- 3- Suivant la sélectivité de la lipase utilisée, des produits aux propriétés prédéfinies peuvent être synthétisés, car la répartition des AG sur les trois positions du glycérol ne se fait pas au hasard comme lors des interestérifications chimiques.
- 4- Enfin, il n'est plus nécessaire de retraiter les produits pour éliminer toutes traces nuisibles de catalyseurs chimiques.

L'avantage majeur réside cependant dans le fait qu'il est possible de choisir le biocatalyseur adéquat suivant le type de biofaçonnement désiré. Tout un choix de lipases sélectives est effectivement possible désormais en passant par les lipases 1,3-régiosélectives, les lipases stéréosélectives, et les lipases typosélectives.

V-2 Conditionnement des lipases et facteurs influençant leurs activités de catalyse

(Plusieurs de mes publications concernent cette partie : La plupart correspondent à des articles de revue sur les différentes techniques de conditionnement des lipases, immobilisation, modification chimique, modification par biologie moléculaire : -

Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Villeneuve P., Muderhwa J., Haas M.J., Graille J., J. Molec. Cat. B: Enz., 9, 113-148, 2000. Article référencé n°13.

Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. I. Lipases: environment effects-selectivities. Graille J., Pina M., Villeneuve P., Agro Food Industry Hightech, July/August, 6-9, 2000. Article référencé n°16.

Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. II. Physico-chemical modifications of lipases and related enzymes. Graille J., Pina M., Villeneuve P., Agro Food Industry Hightech, September/October, 40-43, 2000. Article référencé n°17.

Providing biocatalysts or processes through customizing lipases or other acyltransferases and specially engineered reactions. Graille J., Pina M., Villeneuve P., Recent Res. Devel. Biotech. Bioeng., 4, 7-24, 2001. Article référencé n°18.)

Les divers travaux réalisés dans le domaine du biofaçonnement des corps gras ont démontré que l'eau du système est le paramètre le plus important à maîtriser. En effet, un pourcentage élevé en eau favorise l'hydrolyse alors qu'un faible pourcentage est favorable à la réaction d'interestérification. En réalité, c'est surtout l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) qui conditionne l'état de la structure spatiale de la lipase et donc, oriente son activité enzymatique plutôt vers la synthèse ou plutôt vers l'hydrolyse ; les deux réactions étant toujours en compétition. Muderhwa *et al* (1988) furent probablement les premiers à étudier de façon approfondie l'influence de l'environnement aqueux des préparations lipasiques sur le rendement des réactions d'interestérification catalysées par ces dernières en « milieu fondu », c'est-à-dire sans solvant organique. Ils ont démontré que l'état d'hydratation du biocatalyseur, régit par son a_w et sa teneur en eau, est le paramètre crucial à maîtriser. En effet, lors de ces réactions d'interestérification menées sans solvant et avec des substrats lipidiques exempts d'eau, la phase aqueuse est limitée et exclusivement apportée par la préparation enzymatique. La stratégie qu'ils ont mise en œuvre consiste à réaliser la réaction d'interestérification pour toute une gamme d' a_w entre 0 et 1. L'évolution du rendement de la réaction en fonction de l' a_w du biocatalyseur permet de déterminer l' a_w optimale pour des conditions de réaction données.

Ces auteurs ont aussi démontré la nécessité de tracer l'isotherme de sorption du biocatalyseur afin de déterminer la teneur en eau équivalente à l'optimum d' a_w . Ils furent donc les premiers à tracer l'isotherme de sorption de trois préparations lipasiques microbiennes afin de définir leur état optimal d'hydratation pour catalyser des réactions d'interestérification enzymatique en milieu fondu.

La très grande majorité des lipases mises en oeuvre dans les opérations du biofaçonnement des corps gras sont d'origine microbienne. D'une manière générale, ces lipases sont au préalable conditionnées afin d'améliorer leurs propriétés biocatalytiques et en particulier leur stabilité (domaine de pH, thermostabilité), leur activité catalytique et leur sélectivité ou leur capacité à être plusieurs fois recyclées. Ce conditionnement correspond à une transformation du biocatalyseur qui peut être d'ordre physique, chimique ou biochimique. La modification physique correspond à la fixation de l'enzyme par adsorption ou microencapsulation sur un support inerte. Les modifications chimiques consistent en général à greffer par liaisons covalentes des synthons lipophiles sur des groupements fonctionnels de la protéine enzymatique de manière à en modifier la polarité et rendre plus efficace la lipase en milieu organique. Enfin, les modifications d'ordre biochimique font appel aux techniques de la biologie moléculaire et du génie génétique.

Au sujet des ces dernières techniques, elles sont de plus en plus utilisées pour la mise au point de biocatalyseurs très performants en terme de thermostabilité et d'activité catalytique. A titre d'exemple, j'ai travaillé lors de mon séjour post-doctoral sur la création d'une lipase mutante de lipase de *Rhizopus delemar* afin de modifier la typosélectivité par rapport à l'enzyme initiale

Additive effects of acyl-binding site mutations on the fatty acid selectivity of *Rhizopus delemar* lipase. Klein R.R., King G., Moreau R.A., Mc Neill G.P., Villeneuve P., Haas M.J., J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1401-1407, 1997. Article référencé n°9.

En effectuant les modifications suivantes, Val203Thr + Phe95Asp, dans la séquence d'acides aminés de la lipase de *Rhizopus delemar* il a été possible d'obtenir une nouvelle enzyme lipolytique de typosélectivité très pointue et dont la sélectivité est très fortement dépendante du pH choisi pour la réaction d'hydrolyse. Ainsi à pH neutre, l'enzyme marque une typosélectivité importante pour les acides gras de C8:0 à C14:0 et très faible pour les

acides à chaînes plus courtes. Aux valeurs de pH acides cette typosélectivité est alors moins prononcée et une hydrolyse des acides gras à chaînes courtes est également observée.

V - 3 Valorisation et applications des lipases végétales

(Cette section a fait l'objet d'un article de revue : **Plant lipases and their applications in oils and fats modification**. Villeneuve P., Eur J. Lipid Sci. Technol, 105, 308-317, 2003. Article référence n°20.)

A l'échelle industrielle, nous notons une exploitation *quasi* dominante des lipases microbiennes (Lipozyme™, Novozyme™...). Cependant, ces enzymes microbiennes sont chères à produire (multiplication des bactéries, production des enzymes en conditions contrôlées, purification des lipases produites qui se négocient à 500 €/kg).

Les sources de lipases végétales et leur potentialités en tant que catalyseurs pour le biofaçonnement des corps gras ont été revues notamment par Murkherjee (1995). On trouve des enzymes lipolytiques dans de nombreuses graines oléagineuses ainsi que dans certaines céréales. En règle générale, l'activité lipasique n'est pas détectée dans la graine non germée mais plutôt après germination. Par ailleurs, il est intéressant de noter que beaucoup de lipases de graines oléagineuses présentent une typosélectivité pour l'acide gras majoritaire dans la plante concernée. C'est le cas par exemple de la lipase de *Vernonia galamensis* laquelle est typosélective de l'acide vernolique (Ncube, 1995) ou celle de *cuphea* qui hydrolyse préférentiellement l'acide caprique (Hellyer, 1999).

Les lipases végétales les plus étudiées à ce jour sont sans doute celles issues de l'avoine, du colza et du ricin. Cette dernière par exemple constitue une exception puisqu'elle est détectée avant germination de la graine. C'est une lipase active dans des conditions acides (pH optimum = 4,1) et qui présente une typosélectivité pour l'acide ricinoléique, acide gras majoritaire de l'huile de ricin (Lin, 1986). La lipase de colza (*Brassica napus*) a également été largement étudiée et discriminerait les acides présentant une double liaison *cis* $\Delta 4$ ou *cis* $\Delta 6$ (Hills, 1990). Enfin d'autres lipases de graines oléagineuses ont été décrites telles que celles de l'arachide, du soja ou du lin.

Concernant les céréales, la lipase d'avoine est indéniablement celle qui a été la plus étudiée. Citons par exemple, Piazza *et al* (1992), lesquels ont évalué en hydrolyse de TAG

homogènes la typosélectivité et la régiosélectivité de cette enzyme. Ces auteurs ont alors observé que la lipase ne présentait pas de spécificité de position mais que l'étude de sa typosélectivité montrait une hydrolyse préférentielle pour les acides oléique, linoléique et linolénique alors que les acides palmitique, pétrosélinique ou stéarique étaient beaucoup moins attaqués.

La présence d'enzymes lipolytiques a également été décelée dans d'autres types de préparations végétales, à savoir celles issues des extraits de cannelle (Haslbeck *et al*, 1985), de poivre blanc (Werman *et al*, 1995), des rachis d'*Ananas comosus* (Mukherjee et Kiewitt, 1998), et des tubercules de pomme de terre (Pinsirodom & Parkin, 1999).

L'intérêt porté par ces lipases végétales vient du fait que celles-ci sont généralement employées sous leur forme "brute", c'est-à-dire qu'elles ne sont pas purifiées de l'extrait végétal qui les contient. L'extrait végétal (le plus souvent séché ou lyophilisé) est utilisé en globalité comme préparation lipasique végétale, car cette dernière exprime une forte activité lipasique en l'état. Ces poudres enzymatiques sont disponibles en grande quantité et à un coût très compétitif par rapport à celui des lipases microbiennes.

Cependant, dans la pratique, les choses peuvent ne pas être si aisées car les lipases végétales sont généralement présentes dans des proportions très faibles dans la graine oléagineuse et ce paramètre peut donc limiter leur utilisation à plus grande échelle que celle du laboratoire. Cependant, nous verrons plus loin dans ce document comment certaines lipases végétales non issues de graines oléagineuses peuvent être considérés comme des biocatalyseurs prometteurs dans le cadre de futures opérations du biofaçonnement des corps gras.

Il apparaît que les potentialités des lipases végétales dans le cadre de la biomodification des lipides sont de plus en plus étudiées. Ainsi, Piazza *et al* (1991a, 1991b) ont évalué l'intérêt d'utiliser la lipase d'avoine pour produire de l'acide ricinoléique à partir d'huile de ricin ou pour la production d'acides gras poly-insaturés par hydrolyse sélective d'huiles diverses. Concernant la lipase de ricin (*Ricinus communis*), elle a été mise en œuvre en estérification du glycérol (Piazza *et al*, 1989) ou dans diverses réactions d'hydrolyse (Tüter, 1998 ; Rao, 1992).

L'équipe de Kumar Mukherjee de l'Université de Munster en Allemagne a, quant à elle, beaucoup travaillé sur la lipase de colza. En hydrolyse d'huiles végétales, cette équipe a notamment montré que la lipase n'attaquait que très peu les acides gras comportant une double liaison *cis* $\Delta 4$ ou *cis* $\Delta 6$ et que par conséquent cette enzyme pouvait être un bon biocatalyseur pour enrichir des huiles en acide gamma linolénique (Hills *et al*, 1989). De même, il a été possible d'exploiter la typosélectivité de cette lipase dans des réactions d'alcoolyse sélective d'huile de foie de morue afin d'obtenir des fractions glycéridiques enrichies en DHA (Hills *et al*, 1990b).

Enfin, dans le domaine des phospholipases, des exemples d'utilisation d'enzymes végétales sont aussi connus, le plus important d'entre eux étant sans aucun doute les travaux réalisés avec la phospholipase D du chou. Beaucoup d'articles décrivent l'utilisation de cette enzyme dans des réactions de transphosphatidylaton (pour une revue exhaustive voir Mukherjee, 1995).

Les nombreux exemples donnés ci-dessus confirment que les lipases végétales apparaissent dans certains cas comme de sérieuses alternatives à l'usage des enzymes d'origine microbienne. Leur isolation et leur purification partielles sont effectuées à l'aide de techniques simples, elles sont issues de matières premières très bon marché et les spécificités qu'elles exhibent (en général des typosélectivités) peuvent être avantageusement mises en œuvre pour l'enrichissement spécifique en un acide gras donné ou une famille d'acides gras. Cependant, bien que de nombreux procédés à l'échelle du laboratoire ont été décrits pour des lipases ou phospholipases végétales, il apparaît que le transfert à plus grande échelle peut s'avérer problématique. Ceci est principalement dû au fait qu'il peut s'avérer parfois difficile d'obtenir une quantité suffisante de lipase lorsque celle-ci est issue d'une graine ou d'une plante dans laquelle elle n'est présente qu'en faibles proportions.

Par conséquent, afin de surmonter cette difficulté il nous est apparu très judicieux de cibler notre recherche de nouvelles sources d'enzymes végétales et leur valorisation en étudiant plus spécifiquement des matières premières déjà utilisées à l'échelle industrielle pour d'autres propriétés que leur activité lipolytique. Le principal exemple sur lequel nous avons développé cette stratégie concerne le vaste projet de recherche que nous avons mené sur le latex de *Carica papaya* afin de définir ses potentialités en tant que biocatalyseur du biofaçonnement des corps gras et valoriser les résultats obtenus pour l'obtention de triacylglycérols restructurés à haute valeur ajoutée.

VI - Caractérisation de l'activité biocatalytique du latex de *Carica papaya* pour le biofaçonnement des corps gras

VI - 1 Valorisations industrielles de l'activité protéolytique du latex de *Carica papaya*

Le papayer, *Carica papaya* appartient à la famille des *Caricaceae*, et fait l'objet de cultures assez répandues dans les régions équatoriales et tropicales (Antilles, Brésil, Amérique centrale...). Son latex, localisé dans les canaux laticifères, est récolté en effectuant une série de fentes longitudinales à la surface du fruit vert. L'ensemble du latex frais récolté doit être tamisé afin d'en éliminer les impuretés, puis séché soit en couche mince dans des compartiments fermés, soit à l'étuve, ou soit sous pression réduite (en laboratoire). La méthode couramment employée dans les exploitations est le séchage par air chaud avec un séchoir fermé. Ces modes de séchage permettent d'obtenir un produit blanc crémeux, granuleux et non collant.

Le latex brut de *C. papaya* contient des protéines enzymatiques, des résines, des acides gras, de l'albumine, de la globuline, des peptones et pectines, du glutathion et du benzyl isothiocyanate (qui contribue à la mauvaise odeur du latex). Les protéines enzymatiques peuvent représenter plus de la moitié de la teneur en protéines totales. Les composants enzymatiques majoritaires sont des protéases dont six sont actuellement identifiées : papaïne (ou *papaya* peptidase I), chymopapaïne A, chymopapaïnes-B1, B2 et B3, et *papaya* peptidase. Des carboxypeptidases ainsi que d'autres enzymes y sont aussi présentes, mais en moindre proportion : lipase, lysozyme, amylase, pectine estérase, thioglucosidase, phosphatase acide, invertase, catalase, peroxydase, lipoxydase,... (Poulter & Caygill, 1985).

La papaïne [EC 3.4.22.2] est la plus connue de ces protéases, car la plus étudiée jusqu'alors. Le latex brut et séché de *C. papaya* est commercialisé sous le nom générique de "préparation de papaïne". Dans ce cas, le terme "papaïne" se réfère donc à un latex brut commercial renfermant divers constituants enzymatiques et non enzymatiques. L'ambiguïté vient du fait que ce terme "papaïne" est également employé pour nommer les préparations enzymatiques obtenues après purification des protéases du latex de *C. papaya*, ne contenant plus qu'un mélange d'enzymes protéolytiques. Des préparations à des niveaux différents de purification sont donc généralement commercialisées sous la même appellation "papaïne".

Le marché mondial des préparations de papaïne est principalement situé aux Etats-Unis, Japon et Corée du Sud et à un degré moindre en Europe, Afrique du Sud et Australie. Le prix moyen des préparations brutes de papaïne oscille autour de 27 Euros/kg.

Actuellement, toutes les préparations de papaïne, quel que soit leur niveau de purification, sont exploitées industriellement pour leurs activités protéolytiques. Le secteur agroalimentaire est la première industrie consommatrice des préparations de papaïne. Elles sont majoritairement utilisées pour la clarification des bières. D'autres applications concernent la production d'hydrolysats protéiques à partir de déchets de viandes, de poisson ou de soja pour l'alimentation humaine ou animale ou encore l'attendrissement de la viande dans les pays qui l'autorisent ainsi qu'en panification. Dans le domaine non-alimentaire, pour lequel, un latex de *C. papaya* plus ou moins brut peut être utilisé, cette poudre enzymatique est employée dans l'industrie textile, pour le dégommeage de la soie ou le cardage de la laine, dans le domaine des détergents ou encore en tannerie. L'industrie cosmétique utilise également la protéase papaïne comme agent additif dans des crèmes cosmétiques pour améliorer les propriétés de la peau, lutter contre l'acné, les problèmes de cicatrices ou de rides... Le secteur de la Pharmacologie, qui utilise des préparations de papaïne hautement purifiées, est en pleine expansion. La faculté de digestion des protéines par la protéase papaïne, proche de celle des enzymes présentes à l'état normal dans le tube digestif, est mise à profit dans de nombreuses applications : fabrication de médicaments offrant une aide digestive pour les patients souffrants de problèmes gastriques, la fabrication de préparations pour le nettoyage des plaies.

De plus, la papaïne est également employée en synthèse peptidique.

VI- 2 Activité lipolytique du latex de *Carica papaya*

Bien que le latex de *C. papaya* soit principalement connu et utilisé pour ses activités protéolytiques, il faut noter que dès 1935, une première publication paraît dans laquelle une activité lipolytique (capacité à hydrolyser des TAG à l'interface eau/lipide) exprimée par ce latex est suspectée (Frey-Wyssling, 1935).

Bien plus tard, Giordani *et al* (1991) ont caractérisé plus précisément cette activité en utilisant la tributyrine comme substrat d'hydrolyse. Ces auteurs ont pu montrer que les deux protéases majoritaires du latex de *C. papaya*, à savoir la chymopapaïne (EC 3.4.22.6) et la

papaïne (EC 3.4.22.2), purifiée à partir de ce même latex, n'expriment aucune activité lipolytique ; de même que pour tous les constituants enzymatiques du latex de *C. papaya* solubles en phase aqueuse. Ainsi, ils ont pu démontrer que l'activité lipolytique était bien due à la présence d'une lipase et que par ailleurs cette enzyme était très vraisemblablement immobilisée « naturellement » dans la fraction non hydrosoluble du latex.

Par la suite, comme cela a été décrit précédemment dans ce document, notre équipe a pu montrer en utilisant des triacylglycérols chiraux comme substrats que cette lipase exprimait une forte *sn3* stéréosélectivité en hydrolyse et que cette stéréopréférence était prépondérante par rapport à la courte typosélectivité de l'enzyme par ailleurs existante.

(*Carica papaya* latex lipase: *sn3* Stereoselectivity or short-chain selectivity ? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity. Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J., J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 753-755, 1995. Article référencé n°3.).

VI - 3 Caractérisation de l'activité acyltransférase du latex de *Carica papaya*

Muderhwa *et al* (1988) ont mis en évidence qu'il était possible qu'une préparation lipasique présente un comportement différent en terme d'activité et/ou de sélectivité suivant le type de réaction mis en œuvre (interestérification ou hydrolyse). Ces auteurs ont montré effectivement qu'une préparation lipasique peut avoir une forte activité hydrolytique et présenter, indifféremment, une faible ou forte activité acyltransférase en interestérification, et inversement.

Dans le but de valoriser l'activité lipasique du latex de *Carica papaya*, il nous a donc été nécessaire de caractériser avec précision l'activité de biocatalyse (activité acyltransférase) de cette poudre enzymatique et vérifier notamment si les sélectivités démontrées en hydrolyse étaient conservées dans des réactions d'échanges d'acyles. Dans ce contexte, cette caractérisation a été effectuée dans le cadre d'une réaction d'interestérification où un triglycéride chiral préalablement synthétisé par nos soins (1-butyroyl 2-stéaroyl, 3-palmitoyl-*sn*-glycérol (noté BSP)) a été opposé à un triglycéride homogène (trimyristine) en milieu fondu (sans solvant) en présence du latex de *Carica papaya*. Dans de telles conditions, le fait que le substrat chiral soit parfaitement défini sur les trois positions *sn* du squelette triglycéridique (un seul acide gras par ailleurs différent des deux autres positionné sur une seule position *sn*) permet d'évaluer la sélectivité de l'enzyme étudiée. En effet, à l'aide de techniques chromatographiques en phase gazeuse, l'évolution des échanges d'acyles au cours

de la réaction biocatalysée peut être suivie au cours du temps en quantifiant notamment la formation de triacylglycérols néoformés dont la composition en acides gras diffère de celle des triglycérides initiaux. L'analyse apporte des informations significatives quant à la stéréopréférence manifestée par l'enzyme. Ainsi, chaque échange entre l'une des positions *sn* du triglycéride chiral et un acide gras du substrat homogène est caractérisé par la formation d'un nouveau triglycéride dont le nombre total d'atome de carbone des trois chaînes grasses est bien défini. Dans notre étude, nous avons opposé au BSP (38 C) la trimyristine MMM (42 C). Tout au long de la réaction, la diminution des deux pics initiaux est directement liée à l'apparition de nouveaux triglycérides dont chacun est représentatif d'un échange particulier (Figure 8).

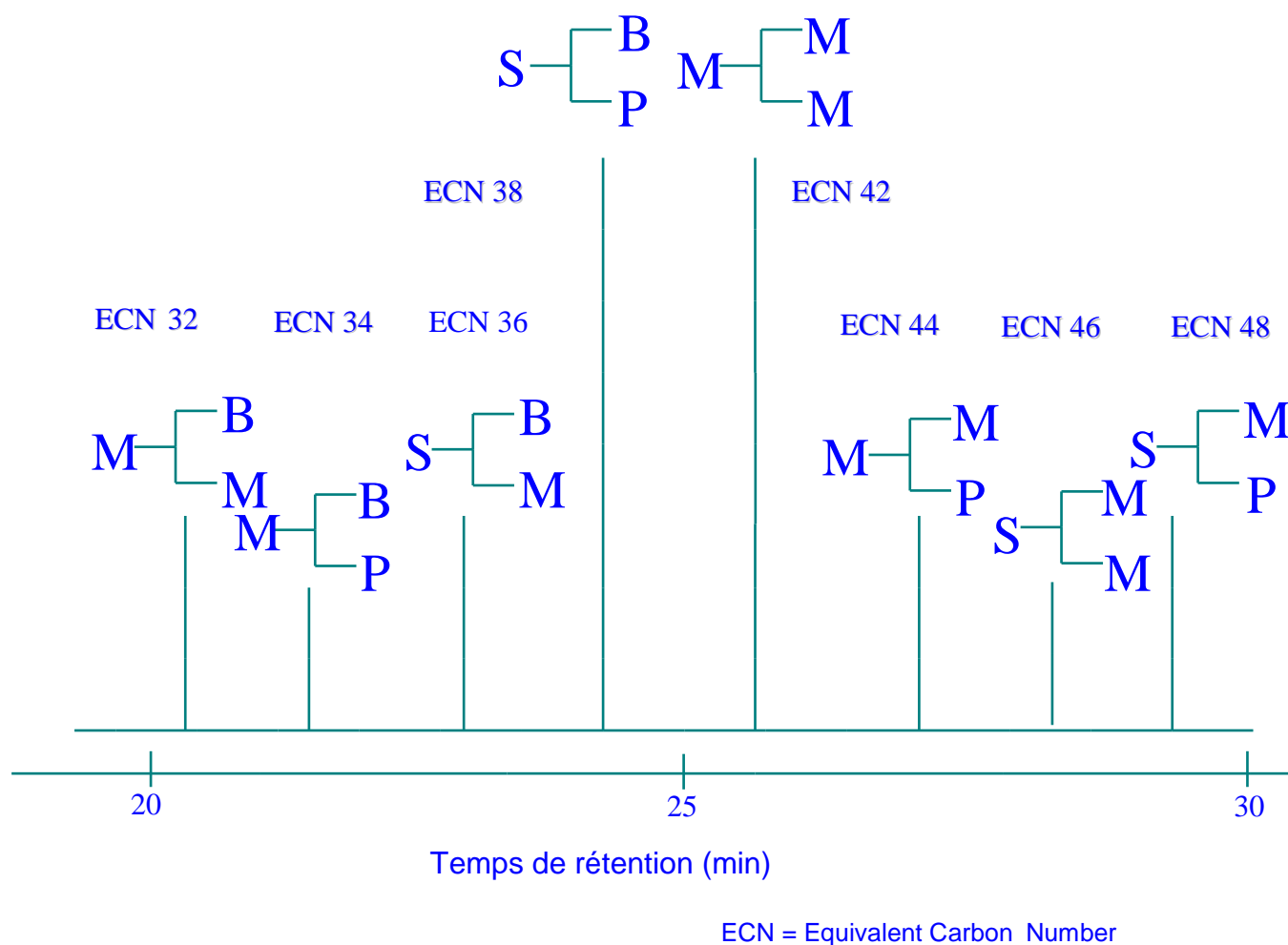


Figure 8 : Mise en évidence en CPG des différents types de transferts d'acyles lors de l'évolution d'une réaction d'interestérification biocatalysée entre le BSP chiral et la trimyristine (MMM).

Par exemple, la paire BSM et MMP correspondant respectivement à 36C et 44C est issue d'un échange entre la position *sn3* du BSP et un des acides myristiques de MMM. Il en est de même pour BMM à 32C et MSP à 48C qui correspondent quant à eux à un échange sur la position *sn1* du substrat chiral. De plus, si l'on considère que les échanges avec la position *sn2* ne sont pas possibles compte tenu de ce que l'on sait par ailleurs du comportement de la lipase testée, on peut considérer que les TAG néoformés contenant 34C et 46C, à savoir BMP et MSM apparaissant au cours de la réaction correspondent très probablement à des TAG de deuxième génération ayant subi un premier transfert d'acyle, ce qui signifie en d'autres termes, que le comportement du biocatalyseur ne peut être jugé qu'en début de réaction, les échanges réactionnels permettant ensuite de nombreuses combinaisons jusqu'à l'équilibre. Dans de telles conditions expérimentales, il nous a été possible de caractériser l'action biocatalytique de *Carica papaya* en interestérification. Nous avons pu en effet observer que d'une part cette enzyme présentait une très bonne activité de transfert d'acyles puisque les TAG néoformés apparaissent dès la premières minutes de la réaction et que par ailleurs, au cours du temps, cette lipase favorise fortement les échanges avec la position *sn3* de BSP et par conséquent que **le latex de *Carica papaya* conserve sa *sn3* stéréosélectivité en réaction de transfert d'acyle.**

(Cette étude a été l'objet d'une publication dont les références sont les suivantes : **Mise en évidence des sélectivités des lipases en interestérification à l'aide d'un triglycéride chiral modèle.** Villeneuve P., Pina M., Graille J., Oléagineux, Corps gras, Lipides, 3, 459-464, 1996. Article référencé n°6).

De même, nous avons essayé d'évaluer la conservation de la courte typosélectivité de cette enzyme en interestérification. Dans ce but, en présence du latex de *Carica papaya*, la tricapryline (Tri C8) a été opposée séparément à différents autres triacylglycérols homogènes variant suivant la nature et la longueur de chaîne de l'acides gras constitutifs (de Tri C4 à TriC22). En suivant les cinétiques réactionnelles pour chacune des réactions d'interestérification, nous avons observé que les échanges d'acyles étaient d'autant plus rapides que les triglycérides opposés à la trioctanoïne étaient à chaînes courtes (figure 9). Ainsi ces expérimentations ont également permis de montrer que **le latex de *Carica papaya* conserve sa courte typosélectivité en réaction de transfert d'acyle.**

(Cette étude a été l'objet d'une publication dont les références sont les suivantes : **Specificity of *Carica papaya* latex in lipase-catalyzed interesterification reactions.** Villeneuve P., Pina M., Skarbek A., Graille J., Foglia T.A., Biotech. Techn., 11, 91-94, 1997. Article référencé n°8.)

Par ailleurs, nous avons également étudié l'activité catalytique de la lipase de *C. papaya* vis-à-vis de la nature du donneur d'acyle (acides gras libres, alkyl esters, vinyl esters...) en réaction de transestérification. Les résultats démontrent que le rendement de la transestérification est optimum avec des AGL ou des esters vinyliques, mais qu'en revanche, peu d'échanges d'acyles sont observés avec des esters méthyliques ou éthyliques.

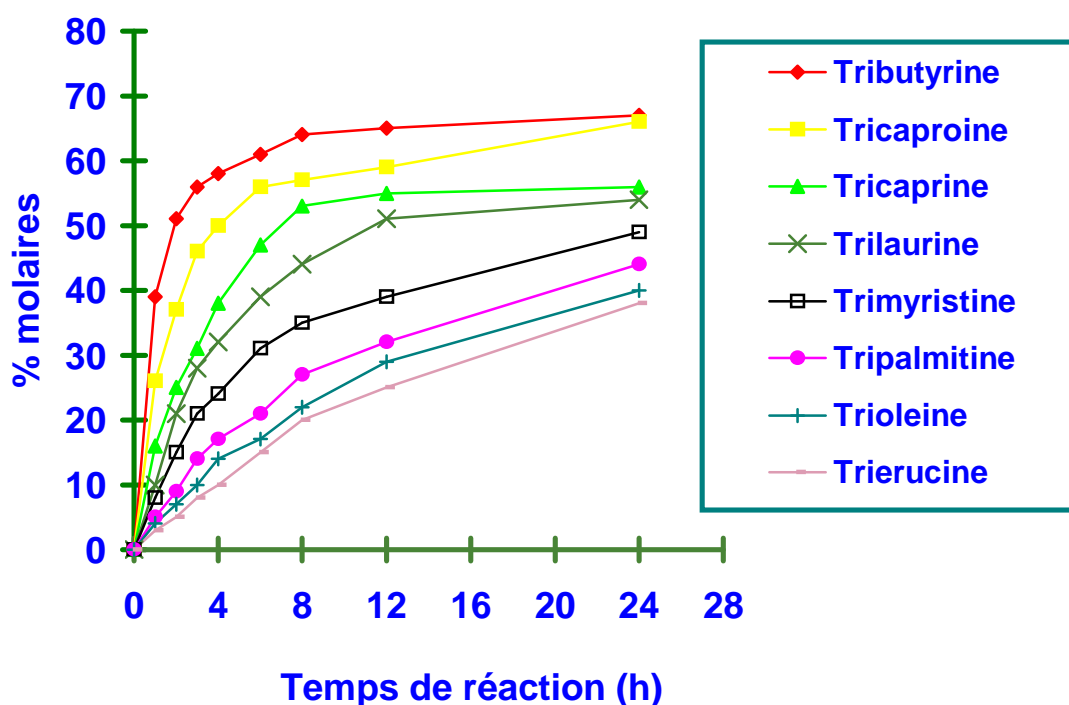


Figure 9 : Cinétique de formation des nouveaux TAGs au cours de l'interestérification de la tricapriline contre des TAG homogènes de différentes longueurs de chaînes

(Conditions expérimentales : ratio molaire substrat Tri C8/TAG homogène = 2:1, solvant =Hexane, T°= 60°C, Quantité d'enzyme 10% p/p)

*(L'étude de l'influence de la nature du donneur d'acyle en transestérification a été l'objet d'une publication dont les références sont les suivantes : **Catalytic behavior of Carica papaya latex in transesterification reactions.** Villeneuve P., Skarbeck A., Pina M., Graille J., Foglia T.A., Biotech. Techn., 11, 637-639, 1997. Article référencé n°10.)*

Nous avons ensuite étudié les activités biocatalytiques de latex de différentes variétés de papayes en évaluant notamment les activités protéolytiques, lipolytiques et de transfert d'acyles (en interestérification) suivant l'origine géographique de la plante. Les activités enzymatiques de ces poudres enzymatiques brutes ont été également comparées à celles de

préparations commerciales de papaines purifiées. Nous avons pu alors observer que les préparations purifiées n'exprimaient qu'une seule activité protéolytique, toute activité de lipolyse étant totalement absente. Pourtant, toutes les poudres enzymatiques brutes quelle que soit leur origine présentaient quant à elles à la fois les trois activités testées. Par ailleurs, aucune relation directe entre activité protéolytique et aptitude à hydrolyser les triacylglycérols n'a été mise en évidence ce qui a permis de confirmer que les deux activités étaient bien distinctes et que l'activité lipolytique observée pour ce latex était bel et bien due à la présence d'une lipase et non pas à une protéase susceptible d'hydrolyser des TAG à chaînes courtes dans des conditions expérimentales données. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par le fait que nous avons également observé que les activités lipolytiques et d'interestérification étaient parfaitement corrélés.

*(Pour des données plus détaillées relatives à cette étude : **Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions.** Caro Y., Villeneuve P., Pina M., Reynes M., Graille J., J. Am. Oil Chem. Soc., 77, 903-909, 2000. Article référencé n°15)*

Enfin, toujours dans le cadre de la caractérisation de l'activité biocatalytique du latex de *Carica papaya* et même si je n'y ai participé qu'indirectement, il est crucial de citer les importants récents travaux de Caro *et al* (2002) qui ont permis de déterminer l'influence de l'environnement aqueux de ce latex sur son activité de biocatalyse. Cette étude très novatrice a permis de déterminer les isothermes de sorption et désorption du latex et définir ainsi ses différents niveaux d'hydratation (activité thermodynamique de l'eau (a_w) et teneur en eau) tout en corrélant ces données avec son activité de synthèse dans des réactions de transfert d'acyle (estérification ou alcoololyse). Ces résultats ont mis en évidence une importante corrélation entre activité de synthèse et niveau d'hydratation initial de l'enzyme (Figure 10). Il a été en effet observé que le rendement optimal de synthèse est obtenu pour une préparation enzymatique stabilisée à une $a_w = 0,22$ ce qui correspond à une teneur en eau de 2%.

Ce taux d'hydratation optimal de l'enzyme se localise dans la partie linéaire de l'isotherme de sorption c'est à dire celle pour laquelle la quantité d'eau présente au sein de la matrice protéique est optimale et liée par des forces de nature intermédiaire de type Van der Waals. Au contraire, pour les valeurs d' a_w trop élevées, l'eau se trouve en excès et contribue donc au déplacement de l'équilibre réactionnel vers la réaction inverse d'hydrolyse. Enfin, pour les valeurs d' a_w très faibles, trop peu d'eau est présente dans le système pour permettre à l'enzyme de présenter une activité biocatalytique satisfaisante. L'eau est alors liée à la

structure protéique par des liaisons hydrogènes empêchant probablement l'enzyme d'adopter sa structure tridimensionnelle optimale.

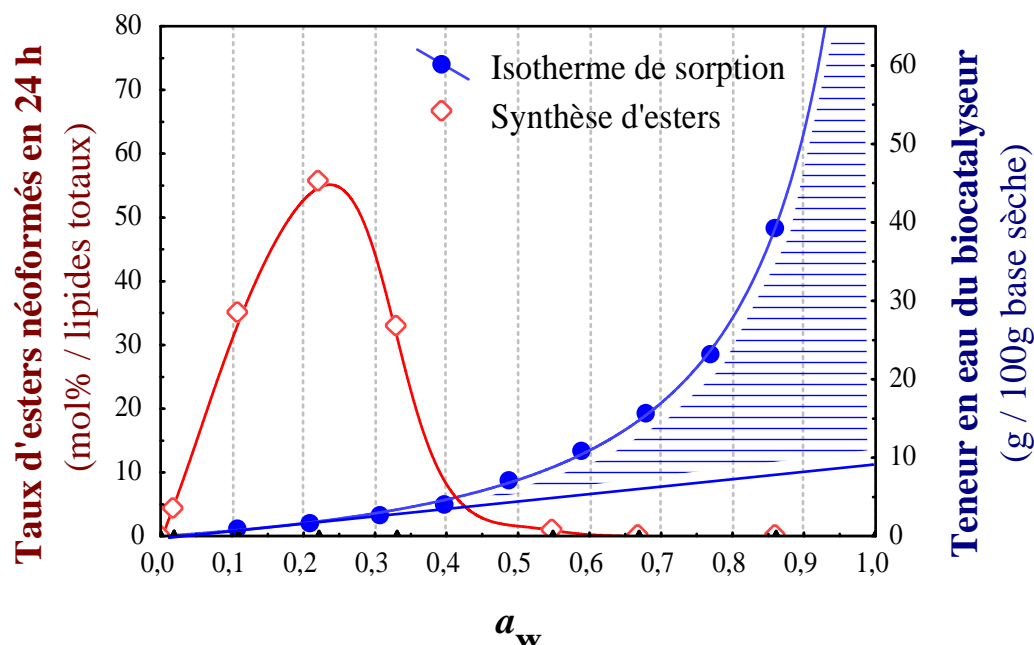


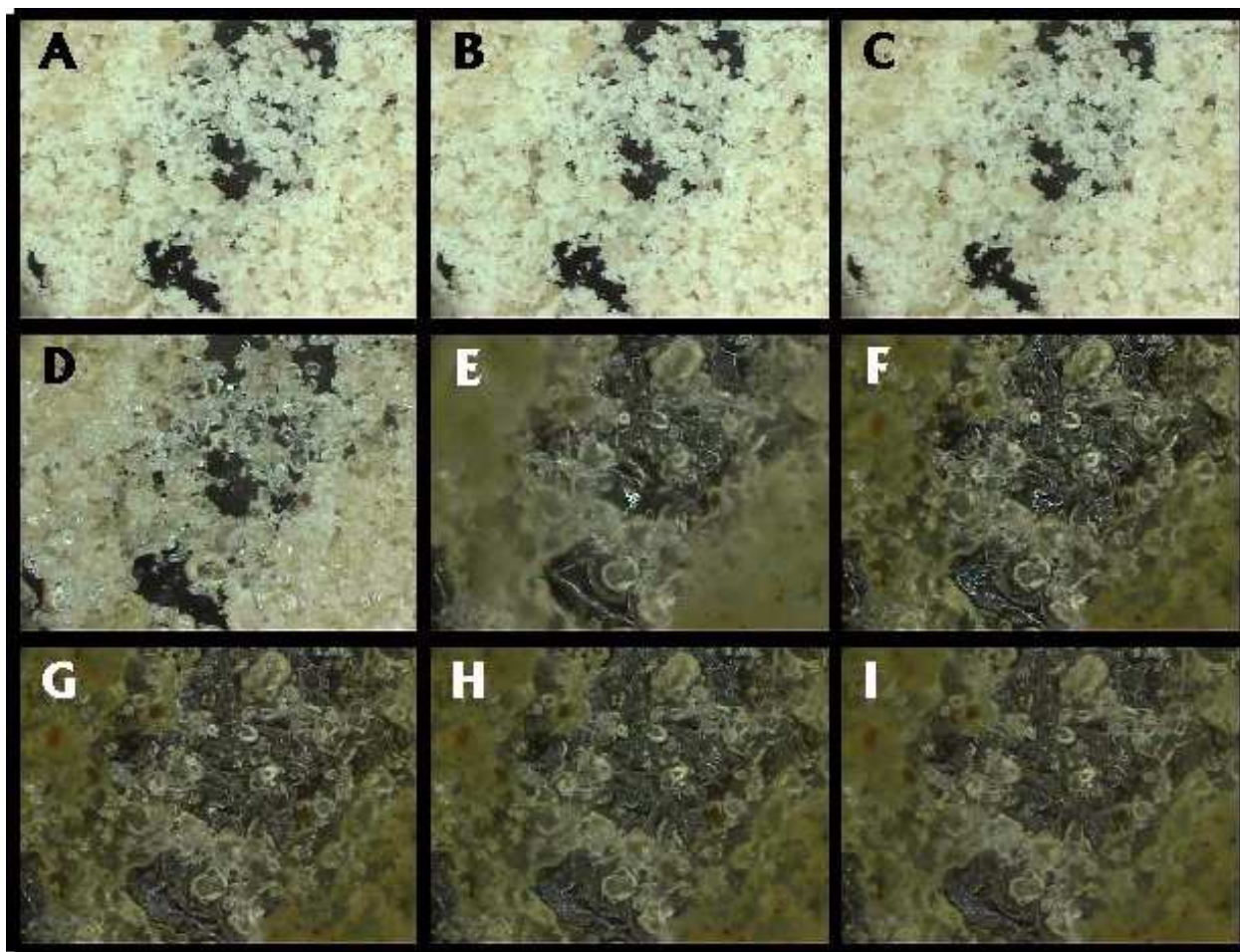
Figure 10 : Influence du taux d'hydratation du latex de *Carica papaya* (a_w et teneur en eau)

sur le rendement d'alcoololyse entre la trilaurine et le n-butanol

(conditions réactionnelles: 55°C, 10 p/p % de biocatalyseur, milieu fondu).

Activité de biocatalyse optimale = $a_w = 0.22$ (teneur en eau 2%). (Caro *et al*, 2002).

Enfin, ces auteurs, dans cette même étude, ont souligné l'importance du stockage du biocatalyseur avant toute opération de biofaçonnement des corps gras. En effet, en étudiant les phénomènes de transitions structurales de ce latex en lui faisant subir artificiellement des phases d'adsorption et de désorption d'eau, il a été observé que ces transitions étaient irréversibles et que l'état pulvérulent du catalyseur, constaté à son activité de l'eau optimale, n'était plus retrouvé une fois que le latex a été hydraté jusqu'à des valeurs d' a_w élevées. En effet, pour des teneurs en eau supérieures à 70%, le latex se gélifie. Cette transformation en gel est alors irréversible et aboutit à un matériau dont l'activité biocatalytique est totalement perdue (Figure 11).



- (A) État initial ($a_w 0,1$) ;
 (B) État du biocatalyseur à $a_w=0,40$ durant la sorption en eau ;
 (C) État du biocatalyseur à $a_w=0,70$ durant la sorption en eau ;
 (D) État du biocatalyseur à $a_w=0,80$ durant la sorption en eau ;
 (E) État du biocatalyseur à $a_w=0,90$ durant la sorption en eau ;
 (F) État du biocatalyseur à $a_w=0,80$ durant la phase de désorption ;
 (G) État du biocatalyseur à $a_w=0,70$ durant la phase de désorption ;
 (H) État du biocatalyseur à $a_w=0,60$ durant la phase de désorption ;
 (I) État du biocatalyseur à $a_w=0,50$ durant la phase de désorption.

Figure 11 : Photographies microscopiques d'une préparation brute de poudre de papaine à différentes valeurs d' a_w au cours de phases d'adsorption et désorption en eau (D'après Caro *et al*, 2002).

VII - Exemples de valorisation de l'activité lipolytique du latex de *Carica papaya* dans des opérations de biofaçonnement des corps gras

VII - 1 Production de substituts de matières grasses de type triacylglycérols structurés à faibles calories

*(Pour un article de revue, sur le thème des substituts de matières grasses, voir : **Les dérivés de lipides acaloriques et bathicaloriques : substituts de matières grasses.** Villeneuve P., Lipides et Corps Gras Alimentaires. Ed J. Graille, Lavoisier Paris, 355-377, 2003. Article référencé n°22.)*

Dans la plupart des pays occidentaux, la consommation excessive de matières grasses demeure un sujet de préoccupation majeur. En effet, différentes enquêtes ont montré que si au cours des dernières décennies la consommation de lipides en valeur absolue n'avait pas significativement augmenté, en revanche le pourcentage de calories apportées par ces derniers s'était très nettement accru. Ainsi, on estime par exemple que dans les populations d'Amérique du Nord ce pourcentage atteindrait des valeurs de l'ordre de 35 à 37% alors que les nutritionnistes recommandent que cet apport calorique ne soit pas supérieur à 30%. Un tel excès dans la surconsommation de matières grasses est bien entendu directement lié à l'augmentation de la fréquence de maladies telles qu'obésité, cancers et problèmes cardiovasculaires.

Afin de lutter contre cette surconsommation lipidique et retrouver un équilibre alimentaire en accord avec les recommandations, plusieurs pistes sont envisageables dont la plus nutritionnellement satisfaisante serait évidemment de travailler à la modification des habitudes alimentaires des consommateurs. Bien que ces derniers soient de plus en plus sensibles à des notions telles que « bons acides gras, matières grasses saturées, insaturées acides gras omega 3 », la « rééducation » des habitudes alimentaires s'avère être une entreprise longue et difficile en raison du réel effort demandé.

Enfin, une dernière alternative pour limiter la surconsommation de lipides est d'utiliser des produits pouvant remplacer les matières grasses et dont l'apport calorique est minimal, voire nul. On parle alors de substituts de matières grasses. De tels produits doivent être en mesure de remplacer les matières grasses usuelles tout en conservant leurs principaux rôles fonctionnels (agent de texture, vecteur d'arômes, etc..) mais sans en avoir les caractéristiques

nutritionnelles. Alors que les protéines et carbohydrates apportent environ 4kcal/g , les lipides en amènent plus du double avec près de 9kcal/g. Par conséquent on attend d'un produit potentiellement capable de remplacer la matière grasse, que son apport calorique, pour une même quantité pondérale consommée, soit significativement inférieur à celui d'un corps gras classique. Ainsi, certains triacylglycérols restructurés répondent à ces attentes ; comme par exemple la Salatrim produite par la société Nabisco et qui ne représente que 55% de l'apport calorique de corps gras classiques (5 kcal/g contre 9 kcal/g). Ce produit est donc qualifié de substitut de matières grasses à faible calorie.

Plus précisément, Salatrim est le nom générique d'une famille de triglycérides structurés produits par Nabisco et dont l'appellation correspond à la contraction de **Short and long chain acid triacylglycerol** molecules. Les acides gras à chaînes courtes présents dans ce substitut sont l'acide acétique et/ou l'acide propionique et/ou l'acide butyrique. Les acides gras à chaînes longues sont quant à eux issus d'huiles végétales totalement hydrogénées telles que le soja ou le colza. Le produit est commercialisé depuis 1995 aux Etats-Unis par Cultor Food Science sous le nom de Benefat.

Les différents types de Salatrim sont obtenus par interestérification chimique randomisée entre des triglycérides homogènes constitués des acides gras courts mentionnés ci-dessus et les triglycérides de l'huile végétale totalement hydrogénée. Le procédé typique d'obtention implique donc une réaction catalysée par le méthoxyde de sodium à des températures pouvant varier de 100° à 150°C et des temps de réaction allant de 5 minutes à une heure. Le mélange obtenu correspond donc à des molécules triglycéridiques contenant chacune un ou deux acides gras à chaînes courtes (acétique, propionique, butyrique). Par ailleurs, l'acide gras à chaîne longue présent est principalement l'acide stéarique en raison de l'hydrogénation complète des huiles végétales employées (soja ou colza). On trouve également en faible quantité les acides palmitique, arachidique et béhénique. Les fonctionnalités des différents mélanges Salatrim sont ajustées en contrôlant leur composition en acides gras à chaînes courtes ainsi que le ratio acides gras à chaînes courtes/acides gras à chaînes longues.

Par le procédé d'obtention des mélanges Salatrim deux types de triglycérides sont formés. Le premier correspond à un triglycéride contenant deux acides gras à chaîne courte et un à chaîne longue et le second à un acide gras à chaîne courte et deux acides gras à chaîne

longue. Ces deux types sont communément appelés SSL triglycérides (Short Long Long) et SLL triglycérides (Short Long Long).

En termes d'applications, il est apparu que les mélanges de SSL et SLL obtenus avaient des propriétés physiques très proches du beurre de cacao notamment au niveau de leur point de fusion toujours compris entre 33 et 38°C quel que soit le ratio SSL/SLL. De plus, les différents mélanges Salatrim présentent un certain nombre d'avantages pour leur utilisation en tant que substituts de beurre de cacao. En effet, en raison du fait que les mélanges Salatrim persistent à garder la forme cristalline alpha, le phénomène de blanchiment bien connu pour le chocolat n'est pas observé pour ce substitut. Il n'est donc pas nécessaire de procéder au tempérage des Salatrim.

Benefat 1 a constitué le premier type de Salatrim commercialisé. Ce produit contient des chaînes stéariques acétiques et propioniques mais pas d'acide butyrique. Ses applications les plus récentes correspondent surtout à la substitution de matières grasses dans des biscuits. A ce jour, l'utilisation de Salatrim n'est autorisée qu'aux USA et au Japon et ce depuis 1994.

En raison du comportement catalytique du latex de *Carica papaya* en réaction d'interestérification, et plus particulièrement du fait que nous ayons démontré la conservation de sa courte typosélectivité pour ce type de réaction, nous avons considéré que cette poudre enzymatique pouvait s'avérer être un biocatalyseur de choix pour la synthèse de TAG restructurés équivalents à la Salatrim et permettre ainsi la mise au point d'un procédé enzymatique alternatif à la voie chimique utilisée jusqu'alors.

Ainsi, en opposant en milieu fondu à 60°C de l'huile de soja complètement hydrogénée à de la tributyrine en présence de 10 p/p% de poudre de latex préalablement équilibrée à son activité de l'eau optimale, nous avons pu suivre la réaction par des techniques chromatographiques et montrer ainsi que cette lipase végétale était en effet parfaitement adaptée à la synthèse de tels TAG restructurés. En effet, nous avons pu observer la formation très rapide de nouveaux triacylglycérols de type SLS et SLL parallèlement à la disparition de substrats initiaux (Figure 12). Après 24 heures de réaction, plus de 70% de TAG néoformés sont obtenus, le type SLS étant majoritaire (40%). De plus, nous avons montré qu'il était possible d'ajuster le ratio des différents types de TAG formés (SLS et SLL) en fonction du temps de réaction choisi. Ainsi, suivant la durée de la réaction il est possible d'obtenir de nombreux mélanges de triacylglycérols restructurés à faibles calories chacun d'entre eux

caractérisé par sa proportion de SLS et SLL. Enfin, nous avons également montré que la poudre enzymatique employée pouvait être recyclée jusqu'à huit fois dans le procédé avant une perte significative d'activité (> 50% de l'activité initiale).

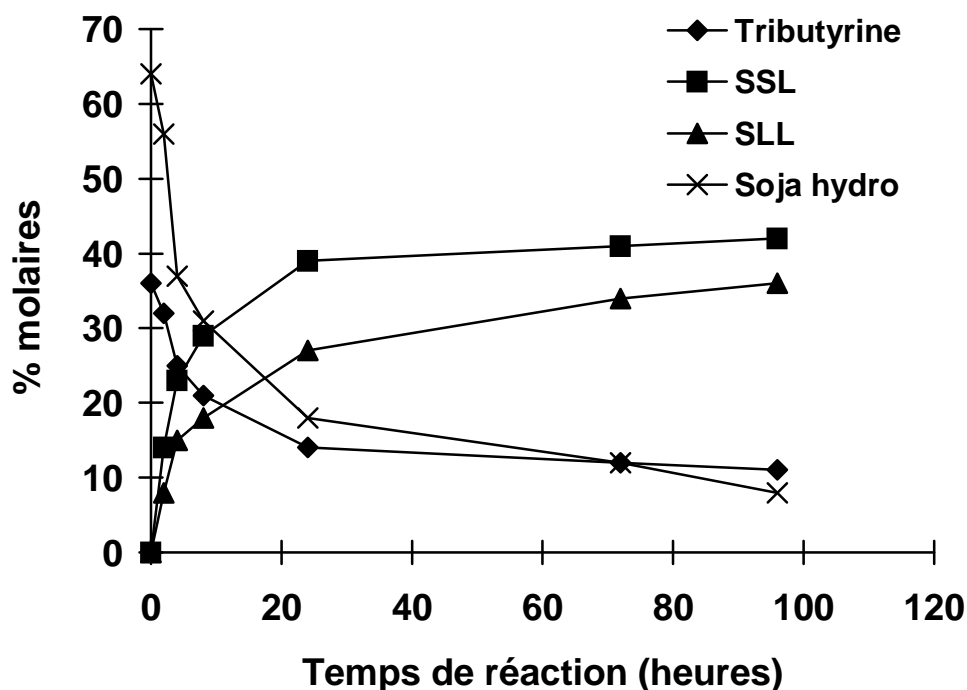


Figure 12 : Évolution de la composition triglycéridique de la réaction d'interestérification entre de l'huile de soja hydrogénée (Soja hydro) et la tributyrine

(conditions opératoires : Rapport molaire des substrats = 1, $t^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, 10 p/p d'enzyme, milieu fondu (SSL = Short Short Long TAG ; SLL Short Long Long TAG))

(Cette étude a été l'objet d'une publication pour un article de revue, sur le thème des substituts de matières grasses, voir : **Carica papaya latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols**. Foglia T.A., Villeneuve P., J. Am. Oil. Chem. Soc., 74, 1447-1450, 1997. Article référencé n°11.)

VII - 2 Production de triacylgcérols restructurés à chaînes moyennes

(Cette partie fait l'objet d'une publication en cours de rédaction : **Selective production of medium-chain fatty acid esters from triacylglycerols via a papaya lipase-catalyzed alcoholysis reaction. Application to copra oil bioconversion and medium-chain triglycerides synthesis**. Caro Y, Turon F., Villeneuve P., Pina M, Graille J., Eur J. Lipid Sci. Technol, en cours de rédaction. Article non référencé.)

Les triacylglycérols à chaînes moyennes (TCM) commerciaux, utilisés en nutrition thérapeutique, sont synthétisés industriellement à partir des acides caprylique (C8:0) et caprique (C10:0), isolés d'huile de coprah. Deux types de TCM sont principalement commercialisés, le plus courant comprenant 60% de C8:0 et le deuxième environ 70% du même acide.

L'obtention de ces TCM se fait en plusieurs étapes chimiques successives nécessitant l'utilisation de conditions assez rudes de température et de pression. Dans un premier temps, une huile de coprah subit une hydrolyse chimique (70 bars, 250°C). Les acides gras libres formés sont alors distillés et les acides capryliques et capriques sont isolés et purifiés. Ces acides gras purs ainsi isolés servent ensuite de constituants de base pour la synthèse des TCM par estérification chimique avec du glycérol. Cette synthèse chimique nécessite aussi un milieu réactionnel complètement anhydre. La réaction de ré-estérification a lieu sous "vide partiel" (pression réduite d'environ 20 mm Hg), en discontinu, sous agitation, à une température comprise entre 150 et 230°C. L'eau est éliminée en continu afin d'accroître le rendement de synthèse. Les catalyseurs chimiques les plus utilisés sont des chlorures d'étain et de zinc ; mais des catalyseurs plus classiques (soude par exemple) peuvent aussi être utilisés. Après réaction, les TCM sont récupérés par distillation et souvent décolorés par passage sur terre décolorante pour garantir la conformité aux exigences pharmaceutiques (normes européennes).

La nature des acides gras et leur distribution sur le squelette triglycéridique régissent, entre autres, les propriétés rhéologiques et nutritionnelles des corps gras. Il est ainsi connu que les TAG renfermant une forte teneur en acides gras à chaînes moyennes possèdent des propriétés nutritionnelles particulières. Ces acides gras confèrent à ce type de TAG un fort potentiel énergétique.

En nutrition thérapeutique, lorsqu'un apport énergétique utilisable rapidement est nécessaire, comme dans les cas de dénutrition et réanimation, l'emploi des TCM est pratiquement systématique. Ces TCM présentent des avantages de par leur digestibilité, absorption et métabolisme. Leur hydrolyse intestinale est nettement plus rapide que pour les TAG constitués majoritairement d'acides gras à longues chaînes. Les acides gras issus de l'hydrolyse de ces TCM traversent facilement la paroi intestinale et sont transportés directement au foie, où ils sont très rapidement métabolisés.

Les utilisations de ces TCM couvrent diverses applications médicales et nutritionnelles : alimentation des prématurés, formulation des aliments diététiques de l'effort, traitement de la malabsorption des lipides dans les cas d'insuffisances pancréatiques et biliaires, d'atteinte de la paroi intestinale, de fibrose kystique, de cirrhose, d'anorexie... (Bell *et al*, 1997).

En raison du mode actuel de synthèse des TCM, il nous est apparu qu'un biofractionnement sélectif des huiles lauriques afin de récupérer sélectivement les AG à chaînes courtes pour une re-synthèse enzymatique de TCM, permettrait d'une part d'accroître le caractère "naturel" des produits obtenus et d'autre part de simplifier le procédé d'obtention des TAG restructurés désirés.

Le procédé que nous avons alors imaginé est constitué de deux étapes :

- Dans un premier temps, des **réactions d'hydrolyse ou d'alcoolyse** du coprah catalysées par la papaine lipase, sont réalisées pour sélectivement récupérer le maximum d'AG courts (≤ 10 C). Ces deux corps gras étant riches en AG courts sur la position *sn*-3 du glycérol, la papaine lipase *sn*-3 stéréosélective nous est naturellement apparue comme un catalyseur de choix.
- Dans un second temps, une **interestérification enzymatique** de l'huile de coprah, déjà riche en TCM sous sa forme native, contre des AG courts est réalisée pour directement accroître la proportion en TCM dans l'huile.

Concernant la première étape, en réaction d'hydrolyse, nous avons observé que même s'il est possible d'obtenir une libération préférentielle des acides gras courts, les taux de lipolyse sont faibles et ne permettent pas d'envisager une extrapolation industrielle à cette étape. En effet, ce taux de lipolyse n'excède pas les 15% et la quantité d'acides gras courts récupérés en fin d'étape s'avère insuffisante (environ 12 g d'AG récupérés pour 100 g d'huile). Concernant la réaction d'alcoolyse dans laquelle les triacylglycérols de coprah étaient opposés à du butanol, nous avons pu montrer que son rendement était bien meilleur que celui de la réaction d'hydrolyse. Par ailleurs, nous avons suivi l'évolution de la composition molaire en AG (Tableau 1) des produits de la réaction, tels que les esters

butyliques d'acides gras synthétisés et les acylglycérols (TAG résiduels, 1,2-DAG, 2-MAG...) et observé un enrichissement de la fraction esters butyliques en acides gras courts.

<i>Temps</i>	-	<i>1h</i>		<i>4h</i>		<i>8h</i>		<i>24h</i>		<i>72h</i>	
AG	TAG	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters
6:0	<u>0,6</u>	0,4	1,3	0,5	1,4	0,5	1,5	0,6	1,6	0,6	1,2
8:0	<u>8,6</u>	6,1	40,8	4,2	38,9	3,9	28,4	2,5	28,6	2,4	22,4
10:0	<u>6,4</u>	5,4	13,0	5,2	12,8	5,2	11,6	5,1	11,3	5,4	9,1
12:0	<u>47,9</u>	57,5	26,3	58,6	24,8	59,2	28,6	58,5	29,1	58,4	31,7
14:0	<u>18,2</u>	15,3	12,3	14,8	13,3	14,4	17,2	13,2	16,2	10,5	18,1
16:0	<u>8,7</u>	7,0	4,0	7,6	4,6	7,9	6,6	8,5	6,7	8,3	9,0
18:0	<u>2,5</u>	2,2	0,9	2,3	1,0	2,3	1,6	3,2	1,6	5,9	2,3
18:1	<u>5,7</u>	4,8	1,3	5,4	2,5	5,2	3,9	6,6	4,0	6,7	5,4
18:2	<u>1,4</u>	1,3	0,1	1,4	0,6	1,4	0,6	1,8	0,8	1,8	0,8
Σ AG courts	<u>15,6</u>	11,9	55,1	9,9	53,2	9,6	41,5	8,2	41,5	8,4	32,7
Rendement de réaction (%)	-	9%		17%		26%		31%		42%	

Tableau 1 : Compositions molaires des AG dans l'huile de coprah native et dans les produits de la réaction d'alcoolyse (en batch) (résultats exprimés en % molaires par rapport à la totalité de l'AG considéré dans l'huile). Le rendement de la réaction est exprimé en moles d'esters butyliques pour 100 moles initiales d'huile (1 mole de TAG donnant 3 moles d'esters).

Nous avons ensuite poursuivi l'étude en évaluant la faisabilité de la réaction d'alcoolyse à plus grande échelle en travaillant dans un bioréacteur à lit catalytique fixe dans lequel le substrat subit plusieurs cycles de transformation successifs. L'évolution de la composition molaire en AG de la fraction estérifiée et de celle des acylglycérols (TAG résiduels, 1,2-MAG et 2-MAG) au cours de l'alcoolyse du coprah et du butanol, menée en bioréacteur avec une a_w de 0,22, est indiquée en tableau 2. Nous avons pu constater que la sélectivité diminue avec l'avancement de la réaction puisqu'au fur et à mesure que la synthèse progresse, il reste de moins en moins d'AG courts disponibles sur la position *sn*3.

<i>Temps</i>	-	<i>0,5h (Cycle 1)</i>		<i>1h (Cycle 2)</i>		<i>1,5h (Cycle 3)</i>		<i>2h (Cycle 4)</i>	
AG	TAG	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters	Acylg.	Esters
Σ AG courts	<u>15,6</u>	14,3	54,7	16,9	47,8	12,6	39,6	11,8	37,6
Σ AG saturés									
- C12 :	<u>47,9</u>	50,0	20,5	48,0	25,0	50,8	27,8	50,1	29,8
- C14 à C18 :	<u>29,4</u>	26,7	17,6	26,5	22,1	26,9	27,0	26,7	27,2
Σ AG insaturés	<u>7,1</u>	9,0	7,2	8,6	5,1	9,8	5,5	11,3	5,4
Rendement de réaction (%)	-	4%		8%		14%		31%	

Tableau 2 : Compositions molaires des AG dans l'huile de coprah native et dans les produits de la réaction d'alcoolyse (en réacteur)

(résultats exprimés en % molaires par rapport à la totalité de l'AG considéré dans le corps gras)

De plus, il est apparu que quatre cycles d'une demi-heure paraissent largement suffisants pour avoir un bon compromis entre quantité d'esters butyliques obtenus (près de 35 g pour 100 g d'huile) et sélectivité de la réaction (toujours près de 40 mol% d'AG courts dans les esters contre 15,6 mol% seulement dans l'huile native). Après le quatrième cycle, la séparation des esters enrichis en chaînes courtes du reste des acylglycérols a été réalisée avec succès par une distillation moléculaire à court trajet

Après avoir déterminé que pour la première étape la réaction d'alcoolyse était largement avantageuse en comparaison à la lipolyse nous avons alors évalué la faisabilité de la seconde étape du procédé, à savoir l'interestérification enzymatique de l'huile de coprah, déjà riche en TCM sous sa forme native par les esters butyliques à chaînes courtes isolés après la première étape d'alcoolyse. Les résultats ont alors montré qu'un enrichissement sélectif en TCM dans l'huile interestérifiée était possible puisque après 72 heures de réaction environ 61 mol% de TCM sont obtenus dans l'huile modifiée alors que l'huile native de coprah n'en contient que 18 mol%.

Pour conclure, si l'on compare la méthode chimique usuelle à la méthode enzymatique que nous proposons pour l'obtention des triacylglycérols à chaînes moyennes, on constate que les mêmes substrats sont nécessaires, mais que la réaction enzymatique mise en œuvre ne nécessite pas une élimination finale des catalyseurs minéraux, ni l'ajout de glycérol pour reconstituer les TCM. Par ailleurs, on arrive à un résultat quasiment similaire, à savoir une

huile fortement enrichie en TCM, directement et en allégeant fortement le processus d'obtention.

On se rend compte aisément de tout le potentiel que pourraient retirer notamment les pays du Sud en développant davantage le procédé. En effet, disposant d'un approvisionnement important en biocatalyseur, ils valoriseraient les huiles lauriques en améliorant la valeur énergétique de leurs constituants. En d'autres termes, ils seraient à même de créer de nouveaux marchés pour leur biomasse végétale en développant en parallèle des aliments-santé (aliments énergétiques très en vogue actuellement).

Enfin, d'un point de vue économique, en intégrant le prix d'achat de l'huile de coprah (0,76 euro/kg pour 1 tonne) et le prix de revient approximatif des AG courts obtenus après fractionnement de l'huile (2,28 euros/kg pour 1 tonne), on se rend compte que cela demeure de surcroît très en deçà du prix actuel des produits finis, puisque les TCM se négocient aux environs de 5 euros/kg.

VIII - Autres sources potentielles de lipases végétales

Les sources de lipases végétales sont bien entendu potentiellement très nombreuses mais toutes n'apparaissent pas économiquement attractives lorsqu'il s'agit d'évaluer la faisabilité industrielle d'un procédé dans lequel interviendrait de telles enzymes. Aussi, nous avons décidé au sein du laboratoire d'orienter nos recherches vers de nouvelles sources d'enzymes lipolytiques végétales en valorisant les matières premières qui sont soit déjà utilisées au niveau industriel pour d'autres types d'activités enzymatiques, soit issues de produits très bon marché ou considérés comme étant des écarts de culture. Seront donc développés à présent nos travaux sur la bromélaïne et sur une plante très voisine de la papaye et produite en équateur (*Carica pentagona*).

VIII - 1 Étude de l'activité lipolytique de la Bromélaïne

La bromélaïne fait partie des protéases végétales les plus utilisées au niveau industriel en même temps que la papaïne et la ficaine (*Ficus carica*). Ses applications sont globalement identiques à celles de la papaïne et l'appellation « préparations de bromélaïne » correspond en fait à une poudre enzymatique issue de l'ananas (*Ananas comusus*) et contenant différentes protéases. En raison de sa grande disponibilité et du fait que cette poudre enzymatique était

déjà largement utilisée au niveau industriel pour ses activités protéolytiques, il nous est apparu intéressant de tester, tout comme pour la papaine, son activité lipolytique.

(Les résultats de ces travaux sont décrits en détails dans : **Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification**. Caro Y., Villeneuve P., Pina M, Reynes M., Graille J., J. Am. Oil Chem. Soc., 77, 349-354, 2000. Article référencé n°14.)

Dans un premier temps, nous avons donc évalué son activité en hydrolyse sur de nombreux TAG homogènes et huiles végétales et comparé les résultats obtenus à ceux de la papaine brute et d'un autre latex extrait d'une plante méditerranéenne laticifère de type *Euphorbia characias*. Dans les conditions d'hydrolyses optimales, la température optimale d'activité catalytique pour la bromélaïne se situe à 50°C. Cependant, en comparaison aux deux autres latex nous avons pu constater que cette poudre enzymatique présentait une très faible activité lipasique (Tableau 3).

Activité lipasique (I.U./g)			
	Latex de <i>E. characias</i>	Bromélaïne brute	Papaine brute
Tributyryne	3500* (=10295**)	64 ± 3 (4.7%) ^a	1590 ± 33
Tricaproïne	950* (=2795**)	45 ± 3 (6.7%) ^a	1350 ± 29
Tricapryline	835* (=2456**)	51 ± 3 (5.9%) ^a	1080 ± 25
Tricaprine	470* (=1382**)	41 ± 3 (7.3%) ^a	1050 ± 27 (2)
TAG de coprah	220* (=647**)	42 ± 3 (7.1%) ^a	590 ± 18
Trioléïne	44* (=129**)	42 ± 4 (9.5%) ^a	55 ± 4 (7.2%) ^a
TAGs d'olive	34* (=100**)	42 ± 3 (7.1%) ^a	68 ± 5 (7.3%) ^a
TAGs de tournesol	48* (=141**)	49 ± 4 (8.2%) ^a	56 ± 4 (7.1%) ^a
TAGs de lin	27* (=79**)	63 ± 4 (6.3%) ^a	52 ± 5 (9.6%) ^a

Les activités sont exprimées en IU/g de préparation brute (ou *IU/mL de latex frais ; ou** IU/g de latex séché). Une I.U. correspond à 1µmol d'acides gras libérés en une minute.

Tableau 3 : Typosélectivités des lipases d'*Euphorbia characias* et des préparations brutes de bromélaïne et papaine.

Par ailleurs, nous avons pu également mettre en évidence une très forte courte typosélectivité du latex d'*Euphorbia characias*. L'étude a ensuite été poursuivie en testant l'activité acyltransférase de la bromélaïne dans des réactions d'interestérification entre la tributyrine et divers triacylglycérols homogènes. Les résultats ont montré que la bromélaïne n'exprimait absolument aucune activité en interestérification.

Ces résultats sont apparus comme étant en contradiction avec ceux obtenus par Mukherjee and Kiewitt (1998) lesquels ont décrit des réactions d'estérification, entre le butanol et des acides gras, biocatalysées par une préparation de bromélaïne. C'est pourquoi nous avons donc poursuivi nos travaux de caractérisation des activités enzymatiques de cette poudre végétale. Dans le cadre d'une étude menée par Caro *et al* (2001) et à laquelle je n'ai pas directement participé, le laboratoire de Lipotechnie a tenté de déterminer les conditions optimales d'utilisation de cette enzyme pour envisager son utilisation dans des opérations du biofaçonnement des corps gras. Cette étude a permis de montrer que l'activité apparente de la bromélaïne en estérification du butanol et d'acides gras n'était pas due à une réelle activité lipasique mais plutôt à une catalyse thermique ayant lieu dans les conditions opératoires choisies. De plus, l'influence de l'état d'hydratation de l'enzyme a été évalué en traçant les isothermes de sorption de ce biocatalyseur. Les résultats ont indiqué que quel que soit son état d'hydratation la préparation de bromélaïne ne présente pas d'activité lipolytique.

VIII - 2 Étude de l'activité lipolytique du babaco (*Carica pentagona*)

(Les résultats de ces travaux sont décrits en détails dans : **Lipase activity in alcoholysis and esterification reactions of crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*)**. Dhuique-Mayer C., Villarreal L., Caro Y., Ruales J., Villeneuve P., Pina M., Oléagineux, Corps gras, Lipides, 10, 232-234, 2003. Article référencé n°23.)

Pour clore cette partie sur les applications des lipases végétales dans le biofaçonnement des corps gras, on peut mentionner les travaux que nous avons récemment menés en collaboration avec nos collègues de l'Ecole Polytechnique de Quito sur la valorisation du latex de babaco. Ce fruit (*Carica pentagona* Heilborn) est une papaye de montagne originaire d'Equateur dont la production a considérablement augmenté ces dernières années. Ce développement peut s'expliquer par une culture peu contraignante, des rendements de production très élevés et des caractéristiques organoleptiques appréciées par les consommateurs. Néanmoins, la saturation du marché, le manque de connaissance sur le produit ainsi que la mauvaise organisation de la filière génère une surproduction du fruit. Par conséquent, une valorisation alternative du babaco apparaît indispensable. Appartenant à la famille des *Cariceae*, le babaco produit un latex qui a des caractéristiques très voisines de celui de la papaye. Nous avons donc initié un programme de recherche pour évaluer les activités enzymatiques potentielles de ce latex et déterminer si ces dernières peuvent être valorisées au même titre que celles du latex de *Carica papaya*.

Ainsi, les deux latex ont été comparés en protéolyse, lipolyse et interestérification. Les résultats ont notamment montré que le latex de *Carica pentagona* présentait des activités protéolytiques et lipolytiques équivalentes à celles de *Carica papaya*. En transferts d'acyle, il semblerait même que le latex de babaco ait une activité plus probante que celle de la papaye (Tableau 4).

Enzyme prep. (latex bruts)	TAG néoformés (% molaires ^a)				Interestérification Unités (IU mg ⁻¹) ^b
	8h	24h	48h	72h	
<i>Carica pentagona</i>	43.4	69.6	74.8	75.2	0.77
<i>Carica papaya</i> 1	19.5	37.3	54.9	56.3	0.34
<i>Carica papaya</i> 2	16.8	44.3	61.9	62.4	0.28

^a Relative standard deviation < 2%

^b Les activités d'interestérification sont déterminées par GC en quantifiant au cours du temps les TAG néoformés. Ces activités sont exprimées en unités initiales d'interestérification (IU) par mg de préparation enzymatique. Une IU correspond à une micromole de TAG néoformés par heure.

Tableau 4 : Activités acyltransférasiques du latex brut de *Carica pentagona* comparées à celles de deux préparations commerciales de papaine (conditions réactionnelles : quantités équimolaires de trilaurine et tricaprène, t°= 50°C, 10 w/w % d'enzyme, solvant : hexane).

Nous continuons actuellement cette étude pour mieux caractériser ses activités de transferts d'acyles mais on peut d'ores et déjà considérer que ce latex de babaco présente un potentiel prometteur pour être utilisé en biofaçonnement des lipides. A ce titre, les premiers résultats d'une étude de faisabilité pour la synthèse de TAG restructurés enrichis en acides gras essentiels feront l'objet d'une prochaine publication en cours de rédaction.

(Application of Babaco (*Carica pentagona*) latex lipase for enzymatic lipid modification. Villarreal L., Xu X., Li D., Dhuique-Mayer C., Ruales J., Pina M., Villeneuve P., Eur J. Lipid Sci. Technol, en cours de rédaction.)

IX - Conclusion

Le biofaçonnement des corps gras s'est développé très rapidement. Il y a à peine plus de quinze ans, la mise en œuvre de lipases pour modifier les corps gras pouvait être considérée presque comme utopique : pourtant c'est devenu une réalité industrielle. Il apparaît en effet que les enzymes lipolytiques présentent de nombreux avantages par rapport aux

catalyseurs classiques parmi lesquels on peut citer le fait qu'elles sont utilisables dans des conditions de températures et pressions douces et permettent ainsi de minimiser la formation de produits secondaires. Cependant, leur propriété la plus remarquable réside dans leur spécificité d'action qui permet d'accéder à de nouveaux produits aux propriétés nutritionnelles et/ou rhéologiques bien ciblées. C'est le cas par exemple des triacylglycérols restructurés dont la composition et la distribution en acides gras sont parfaitement définies.

De nombreux progrès ont récemment été réalisés pour caractériser ces spécificités d'action, comprendre les mécanismes d'action de la lipolyse enzymatique et permettre ainsi le choix du biocatalyseur adéquat pour le biofaçonnement recherché. De plus, les outils de la biologie moléculaire ainsi que les techniques de conditionnement des enzymes (immobilisation) ont permis de produire des biocatalyseurs aux propriétés catalytiques améliorées (activité, spécificité, thermostabilité, capacité au recyclage, etc...) et favoriser ainsi leur utilisation à plus grande échelle que celle du laboratoire.

Jusqu'à présent, l'immense majorité des lipases utilisées est d'origine microbienne ou animale et plus de 90% des publications scientifiques actuelles couvrant le biofaçonnement des corps gras portent sur la mise en œuvre de telles enzymes. Les lipases végétales sont quant à elles beaucoup moins étudiées. Pourtant, en raison de leur coût largement inférieur et de leur grande disponibilité, ces enzymes peuvent être considérées comme une alternative prometteuse à l'usage des lipases microbiennes. En particulier, nous avons vu dans ce chapitre qu'une meilleure connaissance des activités lipasiques de poudres végétales déjà utilisées à grande échelle pour d'autres types d'activités enzymatiques pouvaient permettre de trouver de nouveaux débouchés à ces matériaux dans le domaine de la bioconversion des lipides. Le meilleur exemple illustrant cette aptitude reste celui du latex de *Carica papaya* exploité depuis plus d'un demi-siècle pour son activité protéolytique. Nos travaux ont confirmé que ce latex exprimait également une activité lipasique caractérisée par une forte *sn3* stéréospécificité associée à une courte typosélectivité tant en hydrolyse qu'en transferts d'acyles et que ce comportement pouvait être valorisé pour la production de triglycérides restructurés à haute valeur ajoutée tels que substituts de matières grasses à faibles calories ou triacylglycérols à chaînes moyennes aux propriétés thérapeutiques très recherchées.

Ces premiers travaux ont ouvert la voie à l'étude de nouvelles sources de lipases végétales dans le but d'utiliser ces matières premières afin de mettre au point des procédés enzymatiques économiquement concurrentiels par rapport à ceux déjà existants et qui font appel à des biocatalyseurs d'origine microbienne. Une telle perspective est très encourageante notamment pour les Pays du Sud. On peut en effet imaginer que ces derniers soient alors en mesure de finaliser des procédés dans lesquels le biocatalyseur lipasique employé corresponde à une poudre enzymatique végétale brute issue de ce même pays et jusqu'alors sous-exploitée et dont le potentiel catalytique favorise ainsi la production de matières grasses restructurées spécifiquement adaptées aux problématiques nutritionnelles que connaissent ces pays. De même, le positionnement de cette source végétale en tant que nouveau biocatalyseur lipasique susceptible d'être employé dans le biofaçonnement des corps gras pourrait permettre même, pourquoi pas, à ces pays de conquérir des parts sur « le marché des enzymes » dans les pays occidentaux. Pour mémoire, rappelons que ce marché représente à l'heure actuelle presque deux milliards d'euros par an.

CHAPITRE 3

SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE

LIPOPHILISATION ENZYMATIQUE DE BIOMOLÉCULES

I - Introduction

On qualifie de « lipophilisation enzymatique » l'utilisation de biocatalyseurs (en général des lipases) pour permettre de greffer sur des biomolécules hydrophiles des synthons lipophiles de types acides gras ou alcools gras. Un tel procédé permet alors d'obtenir de nouvelles molécules dont les propriétés biologiques peuvent en théorie être améliorées par rapport à la biomolécule initiale en raison d'une modification de ses propriétés physico-chimiques induite par le greffage de la chaîne grasse. Ainsi par exemple, une molécule hydrosoluble exprimant une activité anti-oxydante verrait cet effet significativement modifié après la lipophilisation. En effet, cette dernière conférerait à la molécule des propriétés amphiphiles lesquelles lui permettraient de se localiser à l'interface dans le cas de milieux émulsionnés et ainsi optimiser la protection de la phase lipidique contre l'oxydation alors qu'un anti-oxydant totalement hydrophile serait beaucoup moins efficace dans de telles conditions.

Ce procédé de lipophilisation peut être appliqué à différents types de molécules et macromolécules de types acides aminés, peptides, protéines ou encore sucres, acides phénoliques ou polyphénols. Là encore, l'avantage de l'utilisation d'enzymes en tant que biocatalyseurs réside dans le fait que la catalyse enzymatique permet d'effectuer alors cette réaction dans des conditions douces de température et de pression, et si possible sans ajout de solvant. A titre de comparaison, on peut citer la lipophilisation chimique des protéines qui s'effectue généralement dans les conditions de la réaction de Schotten-Bauman en utilisant des chlorures d'acides en milieu acide alors que la lipophilisation enzymatique de ces mêmes macromolécules s'effectue directement à partir des acides gras et sans ajout de catalyseur acide.

Les esters de sucres constituent à l'heure actuelle les molécules lipophilisées les plus largement produites. Ils sont obtenus par greffage d'acides gras sur différents types de sucres et trouvent leurs applications en tant qu'émulsifiants principalement dans les industries

agroalimentaires et cosmétiques. De plus, des propriétés antibactériennes, anti-tumorales et insecticides leur ont été attribuées (Lang *et al.*, 2000). Ces esters de sucres sont obtenus à l'aide de lipases mais également de protéases et glycosidases. En fonction de la longueur de la chaîne aliphatique greffée sur le sucre, l'ester de sucre correspondant présente des propriétés variées qui sont fonction de son HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) (Tableau 5).

HLB	Propriétés
1,5-3	Anti-moussant
3-6	Émulsifiant eau/huile
7-9	Agent moussant
8-13	Émulsifiant Huile/eau
13-15	Détergent
15-20	Agent solubilisant

Tableau 5 : Propriétés de surface des esters de sucre en fonction de leur HLB

Outre les esters de sucres, de nombreuses autres molécules lipophilisées peuvent être obtenues par voie enzymatique. Depuis plus de dix ans, le laboratoire de Lipotechnie a étudié la synthèse biocatalysée de telles molécules en particulier des esters ou éthers de sucres (Guillardeau *et al.*, 1992 Chahid *et al.*, 1994, Redmann *et al.*, 1997), des amides gras (Montet *et al.*, 1990) ou encore des protéines ou hydrolysats de protéines lipophilisées (Roussel *et al.*, 1997).

Pour ma part, après mon travail de thèse, j'ai participé activement à la synthèse de tels produits en particulier des amides gras dans le cadre de collaborations menées avec des partenaires industriels des secteurs cosmétiques et pharmaceutiques. Pour des raisons de confidentialité encore en cours, on comprendra que ces travaux ne peuvent pas être décrits dans ce présent mémoire. Seules seront présentées ici les études réalisées récemment sur la lipophilisation d'acides phénoliques (estérification des acides chlorogéniques), de dérivés d'acides aminés (esters gras d'acide pyroglutamique) et de dérivés de sucres (sucres acides de type quinique et glucuronique).

II - Stratégies de synthèse pour la lipophilisation enzymatique de molécules hydrophiles

La principale difficulté à surmonter dans ce type de réaction réside dans le fait qu'il faut faire interagir par l'intermédiaire du biocatalyseur deux substrats de polarités très différentes. Plusieurs paramètres cruciaux sont alors à prendre en considération afin de permettre une synthèse avec des cinétiques réactionnelles et des rendements satisfaisants. Bien entendu, la stratégie la plus intéressante correspond à l'estérification directe en milieu fondu. Cependant, le plus souvent, une telle réaction n'est pas satisfaisante ; car le contact entre les deux substrats n'étant pas optimal, on observe alors que la formation du produit lipophilisé s'avère beaucoup trop lente pour envisager une extrapolation à plus grande échelle.

Quand opérer en milieu fondu n'est pas possible, le choix du solvant est d'une importance majeure. En effet, ce dernier ne doit pas exercer un effet « inactivant » pour l'enzyme tout en permettant une bonne interaction entre les deux substrats. En général, les solvants ayant une valeur $\log P > 3$ ($\log P$ = coefficient de partition d'un solvant entre eau et octanol) sont très utilisés dans le cadre du biofaçonnement des corps gras. C'est en particulier le cas de l'hexane et de l'heptane. Cependant, ces derniers ne sont pas adaptés lorsqu'il s'agit de réactions dans lesquelles deux substrats de polarités très différentes sont impliqués. En effet, la solubilité dans ces solvants de substrats très polaires est très faible ou nulle. Par conséquent, des solvants présentant une valeur $\log P$ inférieure doivent être employés (Tableau 6). C'est le cas par exemple de l'acétonitrile, du tert-butanol, du 2-méthyl 2-butanol, de l'éthyl méthyl cétone. Puisqu'un bon contact entre les deux substrats doit être assuré, c'est souvent des solvants de polarité intermédiaire qui sont choisis, ce qui est le cas des alcools tertiaires qui se trouvent être d'excellents solvants pour ce type de réaction. Ils sont en effet pratiquement inertes pour l'enzyme puisque aucun effet de dénaturation du biocatalyseur n'est observé, et, de plus, en général, leur élimination en fin de réaction pose peu de problème. En outre, il est bon de noter que, contrairement aux alcools secondaires, les alcools tertiaires ne sont pas reconnus comme substrats par les lipases ce qui permet d'éviter ainsi toute réaction secondaire. Enfin, il est évident que le solvant choisi ne doit pas être toxique. A ce titre, il est rassurant de constater que la pyridine souvent mise en œuvre dans les premières publications décrivant l'utilisation de lipases en milieu organique n'est pratiquement plus utilisée actuellement (Therisod et Klivanov, 1986 ; Mutua et Akoh, 1993).

Solvant	Log P	Solvant	Log P
n-heptane	+ 4.00	Tétrahydrofurane	+ 0.49
n-hexane	+ 3.50	Acétone	- 0.26
Toluène	+ 2.50	Acétonitrile	- 0.36
Benzène	+2.00	Ethyl méthyl cétone	-0.80
2-méthyl 2-butanol	+ 1.30	Diméthylformamide	- 1.00
Tert butanol	+ 0.83	Dioxane	- 1.10
Pyridine	+ 0.71	Diméthylsulfoxyde	-1.30

Tableau 6 : Valeurs Log P de différents solvants utilisées en réactions biocatalysées

Un autre paramètre important à considérer pour mener à bien une réaction de lipophilisation biocatalysée concerne le choix de l'enzyme elle-même et son conditionnement. Différentes techniques d'immobilisation, de modification chimique ou de génie génétique ont permis durant ces dix dernières années d'améliorer considérablement les propriétés catalytiques des diverses lipases disponibles sur le marché, et notamment en termes de stabilité (pH et température), d'activité, de spécificités et d'aptitude au recyclage. De nombreux supports internes sont désormais disponibles pour immobiliser les enzymes et obtenir ainsi des biocatalyseurs bien plus performants et plus aisés à mettre en oeuvre que l'enzyme initiale non immobilisée. Par ailleurs, nous avons vu dans le chapitre précédent que le paramètre « clé » à considérer en biocatalyse concerne l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) du biocatalyseur que l'on souhaite employer. Ainsi, il est primordial de bien maîtriser l'influence de ce paramètre sur l'enzyme sélectionnée afin de déterminer son a_w optimale de manière à garantir son activité catalytique optimale et obtenir le produit désiré avec des rendements et des cinétiques réactionnelles optimisés. Pour la majorité des lipases, l' a_w optimale se situe entre 0.25 et 0.45 (Wehtje, et Adlercreutz, 1997). Par ailleurs, nous avons également insisté dans le chapitre précédent sur le fait qu'il était très important de tracer l'isotherme de sorption d'un biocatalyseur comme l'ont montré Caro *et al.* (2002) lors de leur étude sur le latex de *Carica papaya*.

Ceci étant, beaucoup d'autres paramètres influencent également directement les rendements et cinétiques de lipophilisation. Puisque les réactions catalysées par les enzymes sont réversibles, il est souvent avantageux d'essayer de déplacer l'équilibre de la réaction vers la synthèse du produit à obtenir. Pour cela, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre.

- En premier lieu, il est souvent avantageux de travailler avec un large excès molaire d'un des deux substrats. Dans de telles conditions, la réaction d'estérification est

favorisée au détriment de la réaction inverse concurrente d'hydrolyse qui se trouve alors limitée. En général, c'est le substrat lipidique qui est utilisé en excès par rapport au substrat hydrophile.

- La nature du donneur d'acyle influence également l'efficacité de la réaction. A titre d'exemple, l'utilisation d'acides gras libres en estérification directe conduit à la formation concomitante de molécules d'eau qui doivent être éliminées en continu de manière à permettre le déplacement de l'équilibre dans le sens de la synthèse et éviter ainsi toute hydrolyse compétitive à partir du produit d'estérification formé. Le plus souvent, d'autres donneurs d'acyles de type d'esters méthyliques, éthyliques ou vinyliques sont utilisés. Concernant les esters méthyliques et éthyliques, la réaction est alors une transestérification au cours de laquelle du méthanol ou de l'éthanol sont respectivement formés. Ces derniers sont très facilement éliminés du milieu réactionnel, et l'équilibre s'en trouve donc déplacé dans le sens de la synthèse. Le cas des esters vinyliques comme donneurs d'acyles est particulier et très intéressant. En raison d'un effet de tautomérisation, l'alcool vinylique formé après greffage de la chaîne grasse sur le substrat hydrophile est alors irréversiblement transformé en acétaldéhyde, lequel compte tenu de son très faible point d'ébullition est alors éliminé en continu du milieu réactionnel. L'équilibre est ainsi très efficacement déplacé vers la synthèse alors que la réaction inverse s'avère impossible en raison de la disparition (sous forme d'acétaldéhyde) de l'alcool vinylique formé. Ainsi les esters vinyliques s'avèrent être d'excellents donneurs d'acyles très utilisés en biocatalyse (pour une revue sur les autres types de donneurs d'acyles irréversibles voir Faber et Riva, 1992). Cependant, notons que l'utilisation d'esters vinyliques n'est pas adaptée à toutes les enzymes, car certaines études ont montré que les lipases pouvaient parfois être désactivées par l'acétaldéhyde par des mécanismes impliquant la formation de bases de Schiff (Weber *et al.*, 1995).

D'autres stratégies impliquent la modification chimique préalable du substrat hydrophile de manière à abaisser son hydrophilicité et favoriser ainsi sa solubilisation dans le solvant choisi ainsi que son contact avec le donneur d'acyle lipophile. Plusieurs types de modification sont décrits dans la Littérature la plupart d'entre eux concernant la synthèse d'esters de sucres (Lang *et al.*, 2000). La plus commune consiste en l'alkylation préliminaire du composé hydrophile pour former alors des liaisons éthers. A titre d'exemple des dérivés de

sucres alkylés par des groupements méthyliques, éthyliques, n-propyliques ou butyliques se sont avérés être d'excellents substrats pour les lipases afin de permettre une production efficace d'esters gras de sucres même si ce type de stratégie requiert une étape finale de déprotection des sucres par voie chimique (Björkling *et al.*, 1989, Bousquet *et al.*, 1999). Des groupements protecteurs de type isopropylidène, benzylidène ou cyclohexylidène sont également souvent employés pour « hydrophober » le substrat polaire. De nombreuses publications sont disponibles dans la Littérature indiquant que de tels substrats sont acylés par un synthon lipophile puis finalement déprotégés par des méthodes chimiques classiques (Sarney, *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 1999 ; Gridley *et al.*, 1998). Enfin, une autre stratégie de modification préliminaire du substrat hydrophile correspond à sa complexation avec les acides organo boroniques. Ces composés sont connus pour former des complexes boronates avec les diols ou les sucres ce qui entraîne une augmentation de leur solubilité dans le solvant choisi. Cependant, l'acide boronique peut parfois être un inhibiteur de l'enzyme sélectionnée ce qui limite l'intérêt d'une telle approche (Steffen *et al.*, 1992 ; Castillo *et al.*, 1994).

Enfin, d'autres paramètres peuvent également influencer l'efficacité de la réaction. La maîtrise des conditions expérimentales telles que températures, pression, rapports pondéraux enzymes/substrats, type de bioréacteur est également très importante. Pour conclure ce paragraphe et afin de visualiser une approche globale, l'ensemble des paramètres clé régissant l'efficacité d'une réaction de lipophilisation est résumé en figure 13.

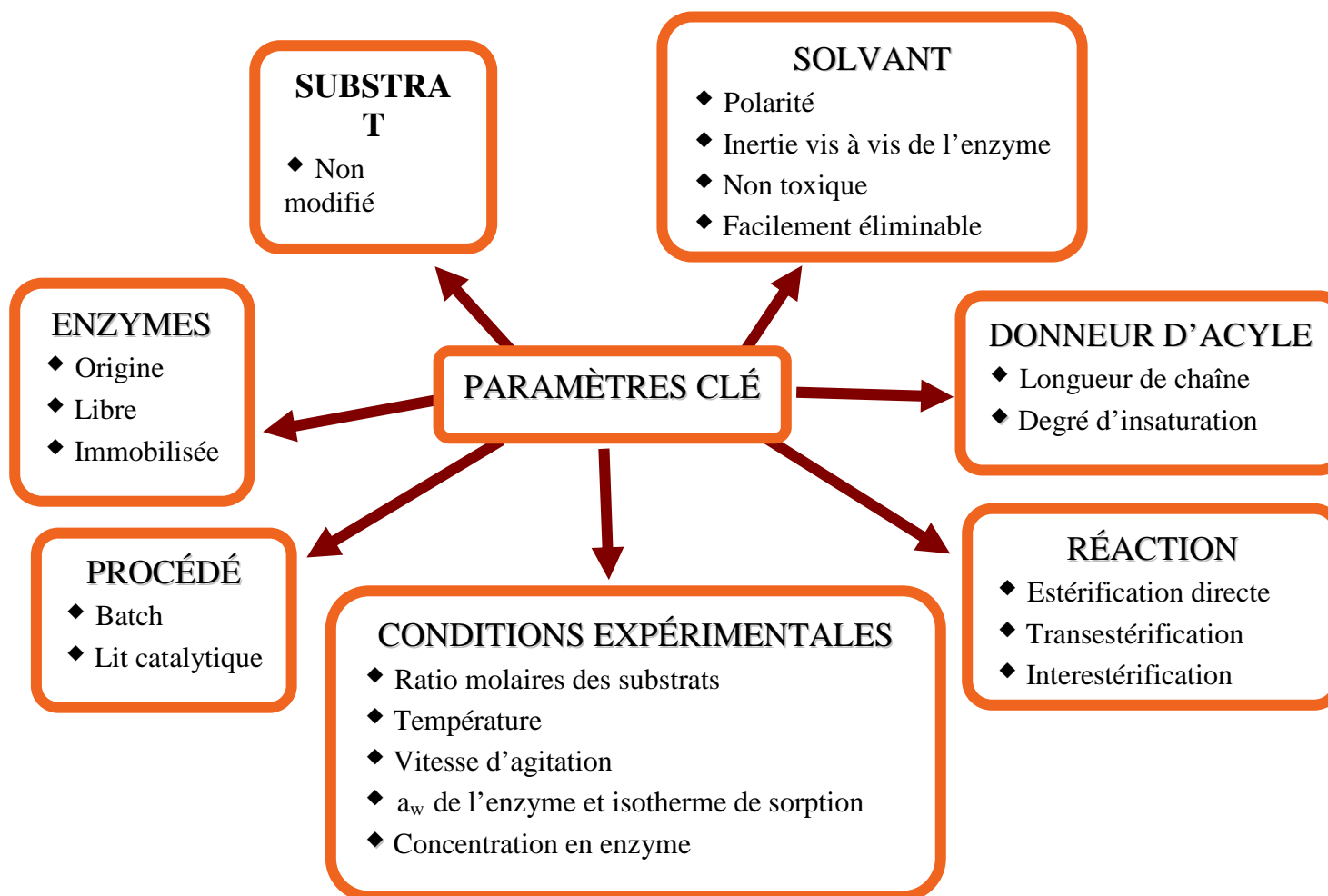


Figure 13 : Les différents paramètres clés à considérer pour les réactions de lipophilisations enzymatiques

III - Lipophilisation enzymatique de dérivés de sucres : exemple de la synthèse d'esters gras d'acides quinique et glucuronique

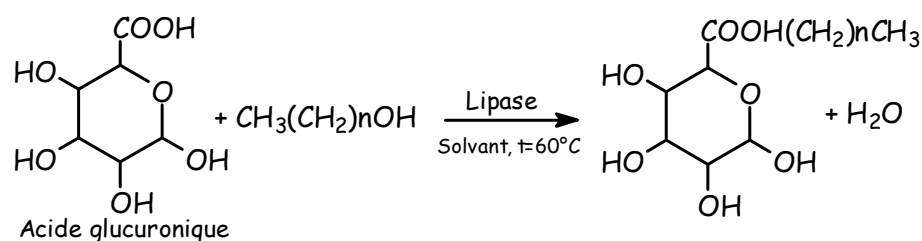
(Le travail décrit ici a fait l'objet d'un article : **Lipase-catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters**. Villeneuve P., Hills G., Bachain P., Pina M., Caro Y., Barea B., Grüning B., Guyot B., Graille J., Eur. J. Lipid Sci. Technol., 104, 394-401, 2002. Article référencé n°19.)

Le laboratoire de Lipotechnie a beaucoup étudié les procédés de synthèse biocatalysées d'esters gras de carbohydrates essentiellement dans le cadre de collaborations avec des partenaires privés des secteurs agroalimentaires et cosmétiques. Divers esters de mono et disaccharides ont été ainsi obtenus avec des rendements satisfaisants. A titre d'exemple, sont décrites ici les synthèses d'esters d'acides quinquiques et glucuroniques que j'ai mises au point durant un partenariat de six mois avec un industriel européen.

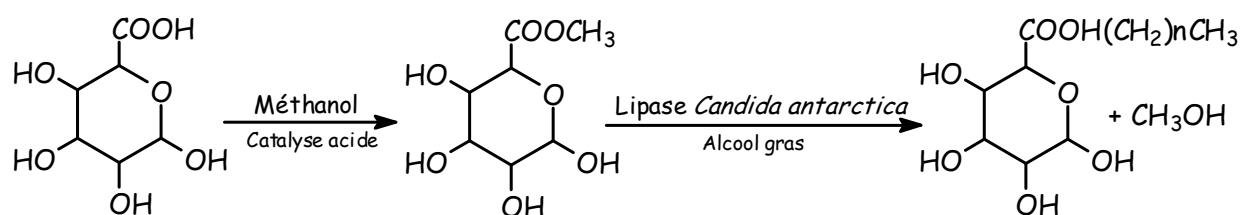
Au début de ces travaux, les publications décrivant l'estérification enzymatique de sucres acides par des alcools gras étaient rares, et à notre connaissance, seule l'équipe de Rolff Schmidt en Allemagne avait publié sur le sujet en décrivant l'estérification de l'acide glucuronique et de l'acide ascorbique (Otto *et al.*, 1998). Cependant, les conditions expérimentales décrites par cette équipe ne nous sont pas apparues satisfaisantes car nous souhaitions privilégier l'estérification directe des acides quinquiques et glucuroniques par les alcools gras (octanol, dodécanol et hexadécanol) et si possible en milieu fondu (Figure 14, stratégie 1).

Très vite, il s'est avéré que la réaction sans solvant n'était pas appropriée car les cinétiques réactionnelles étaient beaucoup trop lentes pour espérer un développement du procédé à l'échelle industrielle. Nous avons donc porté notre choix sur l'utilisation du 2-méthyl 2-butanol en tant que solvant en s'appuyant sur les résultats précédents obtenus dans le cas de la lipophilisation d'extraits phénoliques de café vert. Différentes enzymes ont alors été testées après avoir été préalablement équilibrées à leurs a_w optimales. Nous avons constaté que, là encore, la réaction d'estérification directe n'était pas satisfaisante en terme de cinétique même lorsque celle-ci était effectuée en milieu solvant. En effet, après plusieurs jours de réaction, la formation de dodécyl quinate par exemple n'excédait pas les 20% quelle que soit l'enzyme utilisée. Parmi les différents biocatalyseurs testés, la lipase de *Candida antarctica B* (commercialisée sous forme immobilisée par la société Novo-Nordisk sous le

nom de Novozyme 435) s'est révélée être de loin la plus efficace, en permettant une formation de l'ester désiré avec un rendement de l'ordre de 55% (mais après 30 jours de réaction !). Cette enzyme a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude.



Stratégie 1 : Estérification directe : exemple de l'acide glucuronique



Stratégie 2 : Réaction en deux étapes via la synthèse de méthyl glucuronate

Figure 14 : Stratégies étudiées pour la synthèse d'esters gras de sucres acides

Différents paramètres ont ensuite été évalués dans le but d'améliorer de manière significative les cinétiques de réaction. A ce titre, l'étude de l'influence du solvant a montré que le 2-méthyl 2-butanol restait le meilleur choix et conduisait à de meilleurs résultats que l'acétonitrile ou l'acétone. De plus, nous avons également montré que l'augmentation du ratio molaire alcool gras/sucre acide ou celle de la concentration en substrats ne résultait pas en une amélioration importante de la cinétique réactionnelle.

Ainsi, bien que l'estérification directe des acides glucuronique et quinique par des alcools gras soit apparue possible, nous avons pu constater que la lenteur excessive de cette réaction ne permettait pas d'envisager son développement à une plus grande échelle que celle du laboratoire. Il est très probable que le facteur limitant de cette stratégie résulte en fait de la très faible solubilité du sucre acide dans le milieu réactionnel sélectionné. Par conséquent, nous avons étudié une nouvelle stratégie dans laquelle le sucre acide est au préalable transformé par voie chimique en son ester méthylique de manière à utiliser ce dernier en tant que substrat dans une réaction d'alcoololyse biocatalysée (Figure 14, Stratégie 2).

La synthèse chimique des méthyl quinate et glucuronate a été réalisée avec des rendements quantitatifs en employant en tant que catalyseur une résine échangeuse d'ions fortement acides.

Ce substrat, parfaitement soluble à 60°C dans le 2-méthyl 2-butanol, a ensuite été mis en œuvre dans la réaction d'alcoolyse biocatalysée par la lipase de *Candida antarctica*. Nous avons alors montré que la stratégie N°2 s'avérait bien plus avantageuse que l'estérification directe car la réaction d'alcoolyse présentait des cinétiques réactionnelles beaucoup plus rapides tout en donnant de meilleurs rendements de synthèse (Figure 15).

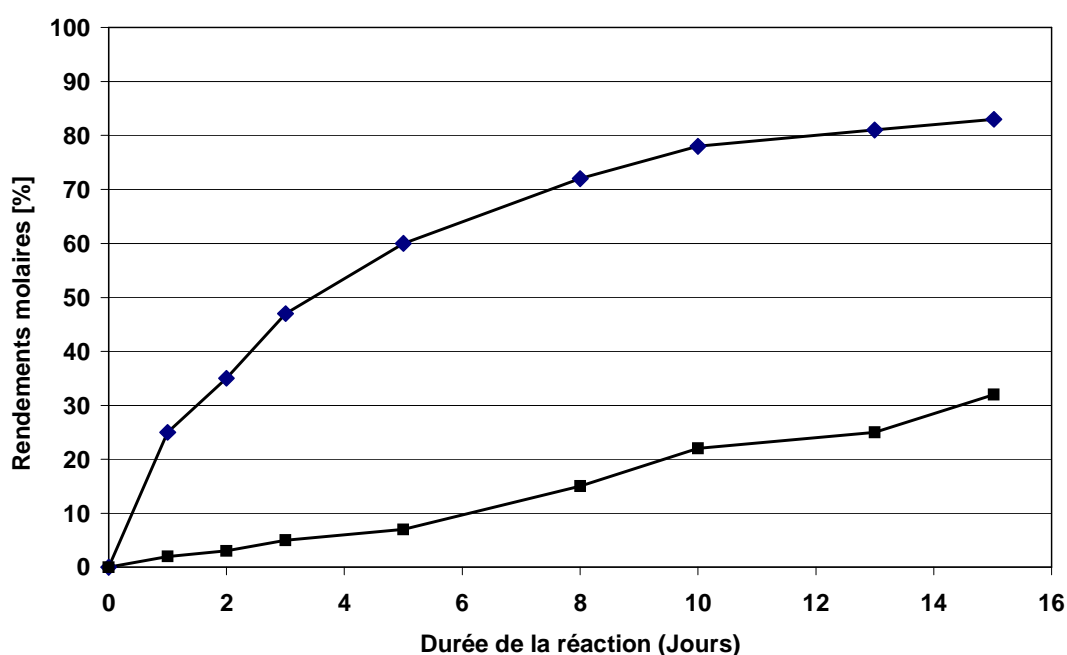


Figure 15 : Comparaison des cinétiques réactionnelles de l'estérification directe de l'acide quinique (■) et de l'alcoolyse du méthyl quinate (◆). (Conditions: ratio molaire carbohydrate ou ester/alcool 1:6, solvant = 2 méthyl-2-butanol, enzyme = *Novozym 435*, T = 60°C).

Par ailleurs, nous avons également évalué l'influence de la longueur de chaînes de l'alcool gars mis en œuvre dans la réaction d'alcoolyse. Nous avons pu ainsi montrer que si l'octanol et le dodécanol avait un comportement globalement similaire la réaction avec l'hexadécanol était bien plus lente avec un rendement inférieur d'environ 30%.

Enfin, pour clore cette étude, nous avons choisi de comparer le procédé chimio-enzymatique décrit précédemment à celui entièrement chimique dans lequel l'étape

d'alcoolyse ne serait plus catalysée par une lipase mais par un catalyseur chimique classique de type résine échangeuse d'ions. (Pour cette comparaison, il est bon de noter que les alcoolyse catalysées par les résines n'ont pas pu être effectuées en utilisant le 2-méthyl-2-butanol comme solvant puisque dans ce cas une forte production gazeuse a été observée, résultant probablement de la déshydratation du solvant par la résine conduisant à la formation d'isobutylène. Ainsi, c'est l'acétonitrile qui a été employé pour toute catalyse chimique)

Les résultats ont montré que l'utilisation de résines pouvait apparaître avantageuse par rapport à la catalyse enzymatique puisque dans le cas de la résine Amberlite IR120H, plus de 80% du produit désiré était obtenu après 24h de réaction (Figure 16).

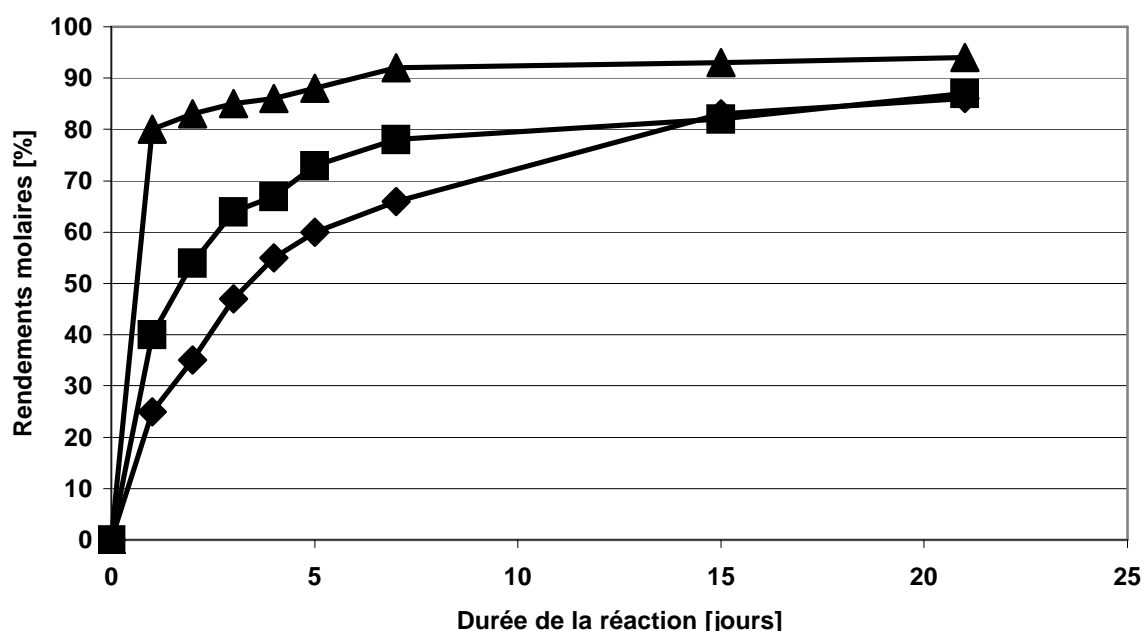


Figure 16 : Comparaison des réaction d'alcoolyse du méthyl quinate par le dodécanol catalysée par la lipase (◆), par la résine *Dowex*(■) ou par la résine *Amberlite* (▲)
(Conditions : ratio molaire ester/alcool 1:6, solvant : 2-méthyl-2-butanol pour la réaction biocatalysée, acétonitrile pour les réaction catalysées par les résines, catalyseur = 10 % p/P, T = 60 C)

En conclusion, cet exemple concernant la production d'esters gras de sucres acides montre bien que même si le procédé d'estérification directe en milieu fondu est « sur le papier » le plus économiquement attractif, bien souvent cette stratégie ne peut être appliquée. En effet, même si les esters désirés ont pu être obtenus par cette approche, les cinétiques réactionnelles sont prohibitives pour envisager une application à plus grande échelle. Nous avons pu ainsi montrer que même si cela implique une étape de synthèse supplémentaire, la

modification chimique préalable du substrat hydrophile permet d'améliorer significativement sa solubilité dans le solvant choisi et ainsi favoriser la catalyse enzymatique.

De plus, cet exemple illustre bien la compétitivité qui peut exister entre procédés enzymatiques et procédé chimique lorsqu'il s'agit d'envisager un développement à l'échelle industrielle. En effet, cet exemple montre que des catalyseurs chimiques classiques peuvent permettre d'obtenir les mêmes produits et avec des cinétiques plus rapides. Dès lors, aux yeux d'un industriel, un procédé enzymatique (impliquant nécessairement la mise en œuvre d'un biocatalyseur relativement coûteux par rapport aux catalyseurs chimiques) n'apparaîtra avantageux que si, d'une part, la stabilité de l'enzyme, sa capacité à être recyclée et manipulée sont satisfaisantes et si, d'autre part, ce même industriel souhaite revendiquer la mise en œuvre d'un procédé enzymatique « vert » apparaissant comme respectueux de l'environnement.

IV - Lipophilisation enzymatique de dérivés d'acides aminés : exemple de la synthèse d'esters gras d'acide pyroglutamique

*(Le travail décrit ici a fait l'objet de deux articles : **Synthesis of pyroglutamic acid fatty esters through lipase-catalyzed esterification with medium chains alcohols.** Villeneuve P., Barea B., Sarrazin P., Davrieux F., Boulanger R., Caro Y., Figueroa-Espinoza M., Pina M., Graille J., *Enz. Microb. Technol.*, **33**, 79-84, 2003. Article référencé n°21.*

Toward the synthesis of pyroglutamate O-lauroyl esters: Biocatalysis versus chemical catalysis. Villeneuve P., Barea B., Barouh N., Turon F., Figueroa-Espinoza M., Piombo G., Dhuique-Mayer C., Pina M., *Biotech. Lett.*, *Accepté*. Article référencé n°24.)

Le laboratoire de Lipotechnie a mené pendant quelques années des travaux portant sur la synthèse biocatalysée d'amides gras par greffage d'acides gras à chaînes moyennes sur des acides aminés de type lysine, glycine, acides aspartique et glutamique. Les produits obtenus étaient principalement destinés à la formulation de crèmes cosmétiques. Pour des raisons de confidentialité, il n'est pas possible de décrire dans ce document l'ensemble de études auxquelles j'ai participé sur le thème de la lipophilisation enzymatique d'acides aminés. Aussi, seul sera détaillé ici l'exemple de la synthèse enzymatique d'esters gras d'acide pyroglutamique.

L'acide pyroglutamique ou acide 2-pyrrolidone-5-carboxylique, est un dérivé d'acide aminé correspondant à la condensation du groupement carboxylique en omega de l'acide aspartique sur son groupement amine. Ce produit de condensation se trouve par conséquent à l'extrémité N-terminale de peptides ou des protéines et donc sa teneur dans les aliments est moins importante que celle des autres acides aminés classiques. Cependant, en tant que produit commercialement disponible et facilement produit par chauffage de l'acide aspartique, l'acide pyroglutamique a un grand intérêt comme réactif chiral pour la synthèse d'agents thérapeutiques (Li *et al.*, 1997, Baldwin *et al.*, 1989). Par ailleurs, ses dérivés, et en particulier les esters gras d'acide pyroglutamique, sont très intéressants pour des formulations cosmétiques. En effet, l'acide pyroglutamique est le principal agent hydratant naturel qui permet à la peau de maintenir son taux d'hydratation optimal. Cependant, lorsqu'il est appliqué sur la peau sous forme de crème, il est facilement éliminé et n'a donc qu'une action temporaire limitée. Pour limiter cet inconvénient, l'utilisation d'esters gras d'acide pyroglutamique et en particulier ceux obtenus à partir de chaînes lauriques, a été proposée (Black et Scott, 1993). Ces composés sont en effet avantageux parce qu'ils peuvent pénétrer la peau et constituer un substrat pour la pyroglutamate peptidase (E.C 3.4.19.3) et permettre ainsi, après hydrolyse par cette enzyme, la libération *in situ* de l'acide pyroglutamique. Etant donné que la production d'acide pyroglutamique par l'organisme est limitée, un traitement de la peau avec ces esters gras permet à cette dernière de disposer de réserves importantes en acide pyroglutamique ce qui a induit un effet positif sur le maintien de l'hydratation optimale du tissu adipeux. Enfin, mentionnons également l'existence de quelques brevets sur l'utilisation des esters gras d'acide pyroglutamique en tant qu'agents favorisant la pénétration à travers la peau d'agents thérapeutiques (Jose et Takeru, 1991).

Cependant, dans la plupart des publications citées ci-dessus, les esters gras d'acide pyroglutamique sont synthétisés par des méthodes chimiques fastidieuses impliquant de nombreuses étapes de purification ainsi que l'utilisation de solvants organiques chlorés et de catalyseurs du type dicyclohexylcarbodiimide, 4-diméthylaminopyridine ou acide chlorhydrique concentré. C'est pourquoi, l'industriel avec lequel nous collaborons sur le sujet était intéressé par l'étude de la faisabilité d'une synthèse biocatalysée pour obtenir les esters gras désirés dans des conditions expérimentales douces et si possible respectueuses de l'environnement.

En se basant sur notre expérience antérieure et sur une publication récente dans laquelle Conde *et al.* (1999) montraient que les éthyl pyroglutamate étaient de bons substrats de la lipase de *Candida antarctica* B dans des réactions d'amidation, nous avons d'abord choisi de cibler notre étude sur cette enzyme sous sa forme immobilisée (Novozyme 435, Novo-Nordisk).

Nos premiers essais ont correspondu à l'étude de l'estérification directe de l'acide pyroglutamique en utilisant le 2-méthyl 2-butanol comme solvant en raison de sa polarité intermédiaire permettant une solubilisation partielle des deux substrats sans pour autant affecter l'activité catalytique de l'enzyme. Malheureusement, de manière similaire à ce qui a été observé pour la lipophilisation des sucres acides décrite dans ce chapitre, il s'est avéré que cette stratégie donnait des cinétiques beaucoup trop lentes. Nous avons donc très vite adapté une voie de synthèse en deux étapes dans laquelle l'acide pyroglutamique est transformé chimiquement dans un premier temps en son ester éthylique, afin que ce dernier soit utilisé comme substrat dans une seconde étape d'alcoolyse avec les alcools gras sélectionnés (Figure 17).

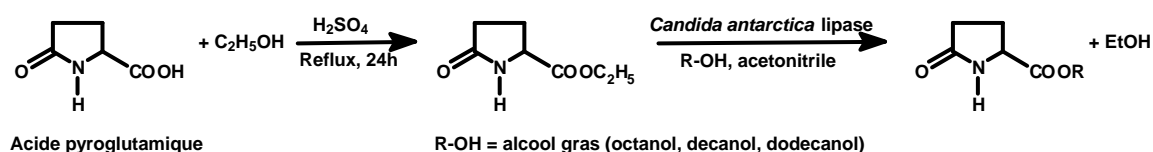


Figure 17: Voie de synthèse pour l'obtention d'esters gras d'acide pyroglutamique

Les avantages de cette stratégie résident dans le fait d'une part que l'éthyl pyroglutamate est parfaitement soluble dans les solvants sélectionnés pour cette étude, et d'autre part que son alcoolyse génère conjointement de l'éthanol lequel peut être éliminé en continu du milieu réactionnel et contribuer ainsi au déplacement de l'équilibre vers la synthèse.

Après avoir synthétisé quantitativement l'éthyl pyroglutamate par voie chimique, ce dernier a été mis en œuvre dans différentes réactions d'alcoolyse dont les paramètres variants étaient la nature du solvant employé, la quantité d'enzyme utilisée, le rapport molaire des deux substrats et enfin la longueur de chaîne de l'alcool gras.

Concernant la concentration en enzyme, nous avons pu montrer qu'en absence de biocatalyseur aucun ester gras n'était formé et que la quantité la plus adaptée en termes de rendements et d'attractivité économique correspondait à une utilisation de la lipase à 10% en poids par rapport à la quantité des deux substrats.

L'influence de la nature du solvant a été étudiée et nous avons pu observer que l'acétonitrile donnait les meilleurs résultats (Figure 18).

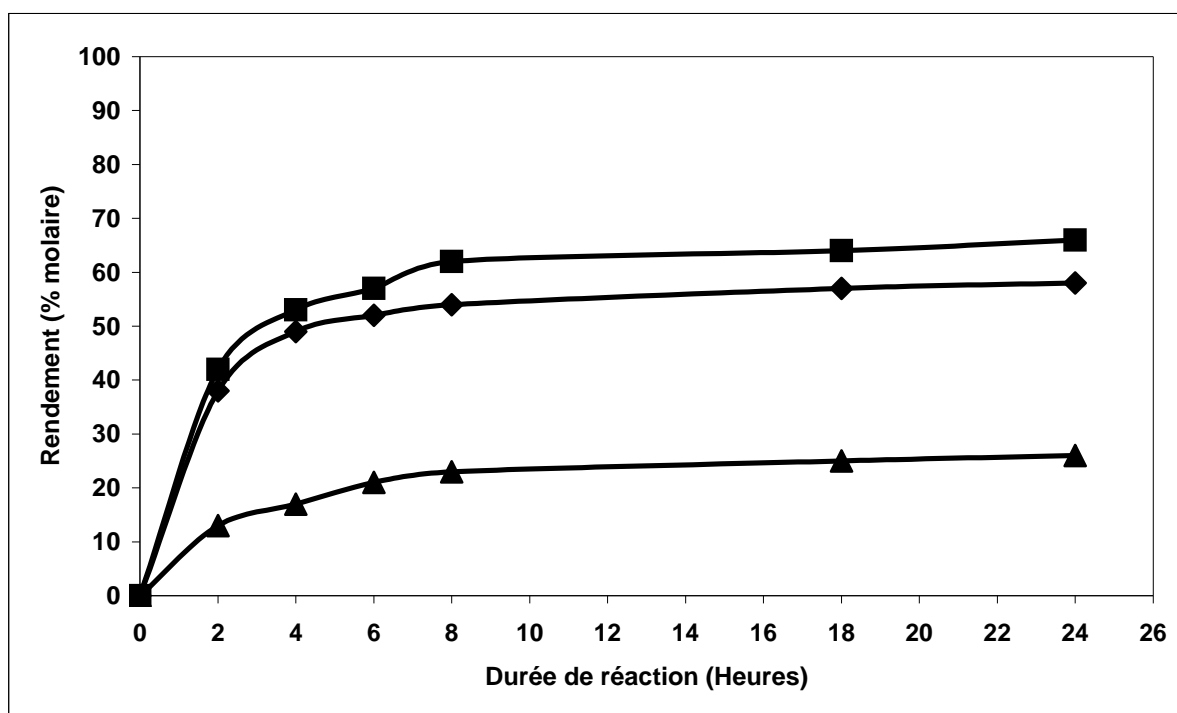


Figure 18 : Influence de la nature du solvant sur la cinétique réactionnelle de l'alcoololyse entre l'éthyl pyroglutamate et le dodécanol. (Conditions: Lipase: *Candida antarctica* B, 10 p/p % ratio molaire Ester/alcool 1:3, T = 60°C). Symboles: (■) acétonitrile, (◆) 2-méthyl-2-butanol, (▲) acétone

Au contraire, l'acétone n'était pas appropriée pour cette réaction, probablement en raison d'un phénomène de dénaturation de l'enzyme comme cela a été décrit par d'autres auteurs (Li et Rethwisch, 2002) qui ont notamment montré que cette enzyme pouvait perdre jusqu'à 50% de son activité initiale en cas de contact prolongé avec ce solvant.

L'étude de l'influence du rapport molaire des deux substrats a été menée en faisant varier ce paramètre de 1:1 (mélange équimolaire) à 1:10 en faveur de l'alcool gras (Figure 19). Comme on pouvait s'y attendre que le ratio équimolaire n'est pas avantageux car

les rendements de la réaction étaient très faibles en comparaison à ceux obtenus en excès d'alcool gras. En effet, en conditions équimolaires, il n'y a pas de déplacement de l'équilibre vers la synthèse ce qui est le cas au contraire lorsqu'un large excès d'alcool est employé. Pour cette réaction en particulier nous avons estimé que le ratio molaire présentant des cinétiques convenables tout en préservant la rentabilité économique du procédé était de 1:5 en faveur du substrat lipophile.

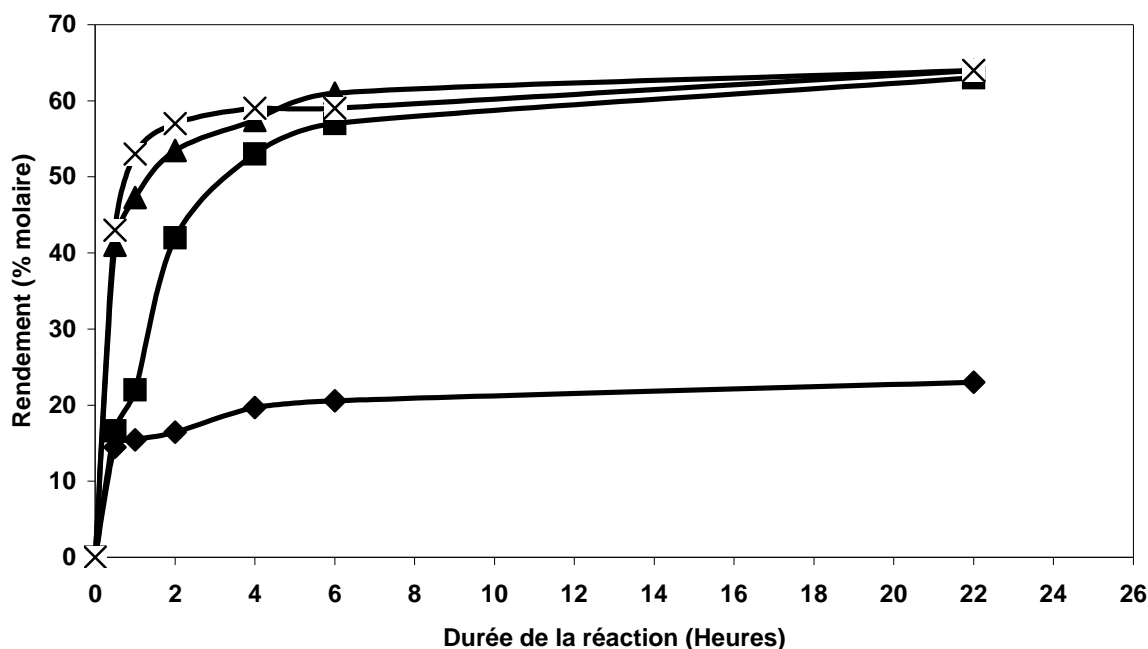


Figure 19 : Influence du ratio molaire (éthyl pyroglutamate/alcool gras) sur la cinétique réactionnelle de la réaction d'alcoolyse entre le dodécanol et l'éthyl pyroglutamate.

(Conditions réactionnelles : Lipase: *Candida antarctica*, 10 p/p % solvant : acétonitrile T = 60°C).

Symboles : (◆) 1:1, (■) 1:3, (▲) 1:5, (✕) 1:10.)

Nous avons récemment poursuivi cette étude en évaluant les potentialités d'autres lipases d'origine microbienne ou végétale à catalyser cette même réaction. Il s'est avéré que la lipase de *Candida antarctica* B restait de loin l'enzyme donnant les meilleurs résultats. Par ailleurs, nous avons pu montrer qu'il était plus avantageux de travailler avec le méthyl pyroglutamate plutôt que l'éthyl pour la réaction d'alcoolyse. En effet, avec l'ester éthylique, l'élimination en continu du méthanol est plus efficace que celle de l'éthanol dans le cas de l'éthyl pyroglutamate ce qui contribue à gagner quelques % sur les rendements finaux. Enfin, comme cela a été effectué pour la lipophilisation des sucres acides, nous avons également comparé l'activité catalytique de la lipase avec celles des résines échangeuses d'ions pour

l'alcoolyse du méthyl pyroglutamate (Figure 20). Contrairement à ce qui avait été observé pour les esters d'acides quinique et glucuronique, ici la catalyse enzymatique donne les meilleurs résultats en terme de cinétique et de rendements.

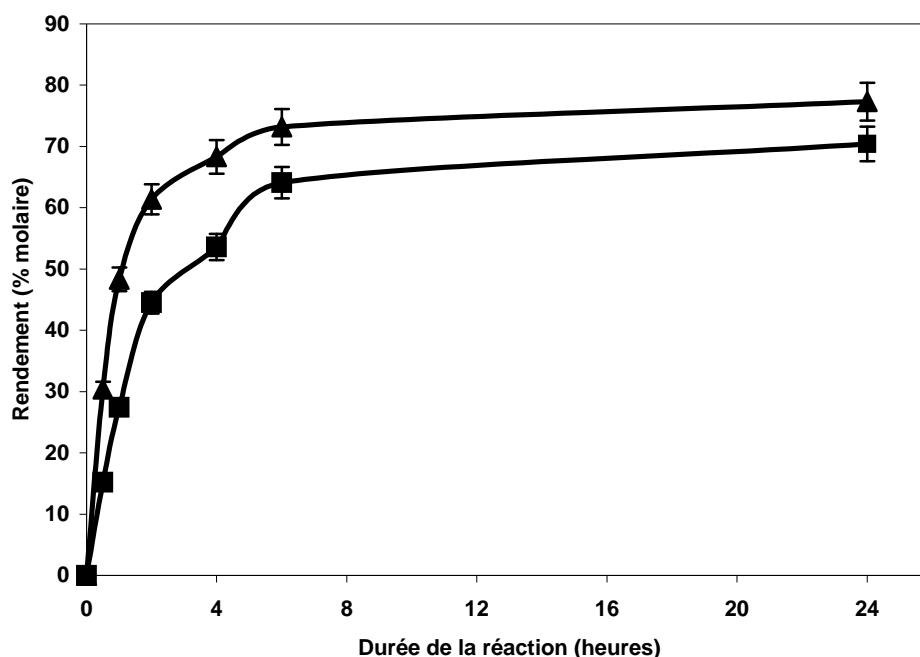


Figure 20 : Comparaison des cinétiques réactionnelles lors de l'alcoolyse du méthyl quinate et du dodécanol catalysée par la lipase de *Candida antarctica* lipase (▲) ou par la résine by Amberlite IR120H (■).

(Conditions: quantité de catalyseur 10% p/p, $t^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, ratio molaire des substrats 1:5, solvant: acétonitrile)

En conclusion, cette étude de faisabilité de production par voie enzymatique d'esters gras d'acide pyroglutamique prouve que le procédé biocatalytique est ici très avantageux par rapport aux procédés chimiques déjà existants puisqu'il permet d'obtenir les produits désirés dans des conditions plus douces et avec des rendements très comparables. Cet exemple illustre bien les potentialités de la biocatalyse pour la synthèse de molécules multifonctionnelles par greffage d'une chaîne grasse sur un synthon hautement hydrophile. La disponibilité commerciale de lipases immobilisées présentant des activités catalytiques importantes ainsi que des stabilités satisfaisantes, permet la mise au point de bioprocédés respectueux de l'environnement et donnant accès à de nombreuses molécules de très hautes puretés ayant des applications principalement dans les secteurs de la cosmétique ou de l'industrie pharmaceutique.

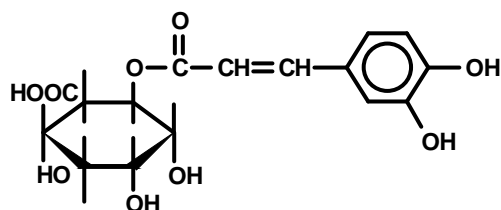
V - Lipophilisation enzymatique des polyphénols et acides phénoliques : cas des acides chlorogéniques

(Cette section a fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage scientifique actuellement sous presse : **Lipophilization of phenolic compounds by lipase-catalyzed reactions**. Villeneuve P., Handbook of Lipid Enzymology, Editor Xuebing Xu. Eds Marcel Dekker. Article référencé n°25.)

Concernant les molécules complexes telles que les polyphénols ou acides phénoliques, les publications scientifiques traitant de leur lipophilisation enzymatique sont encore rares et, à notre connaissance seules deux ou trois équipes européennes, dont la notre, travaillent sur le sujet. Sur ce thème, nous avons axé nos travaux sur les acides phénoliques issus de la graine de café vert et en particulier les acides chlorogéniques.

Suivant la variété de café, *Coffea arabica* ou *Coffea robusta* le taux de composés phénoliques varie pondéralement de 5,5 à 12% de l'extrait sec de café vert. Il s'agit principalement de dérivés de l'acide cinnamique en particulier les acides caféique et férulique. On les trouve soit sous forme libre soit sous forme d'esters ou diesters de l'acide quinique, on qualifie alors l'ensemble de ces composés d'acides chlorogéniques (Figure 21) (Clifford, 1985). Parmi eux, l'acide 5-cafeoyl quinique correspond au constituant majoritaire.

Les acides chlorogéniques sont partiellement solubles dans l'eau et expriment de très fortes activités antioxydantes (Maruta *et al.*, 1995) et bactéricides (Scholtz *et al.*, 1994).



ACIDES CHLOROGENIQUES (exemple de l'acide 5-O-cafeoyl quinique)

Autres acides:

Acides 3-O-, 4-O- ou 5-O-cafeoyl ou coumaroyl ou feruloyl quinique
Acides 3,4-, 3,5-, 1,3- ou 1,5-Di-O-cafeoyl quinique
Acide 3,4,5-Tri-O-cafeoyl quinique
Acide 3-O-cafeoyl-4-O-feruloyl quinique
Acide 3-O-feruloyl-4-O-cafeoyl quinique

Figure 21 : Structure chimique des acides chlorogéniques

Les possibilités de greffer sur ces acides chlorogéniques des chaînes grasses pour modifier leur HLB sont intéressantes car elles devraient permettre d'obtenir de nouvelles molécules multifonctionnelles combinant propriétés émulsifiantes et propriétés biologiques des acides chlorogéniques non modifiés. Cependant, l'estérification chimique de la fonction carboxylique des acides chlorogéniques s'avère délicate en raison de leur faible thermostabilité et du fait qu'il ont tendance à s'oxyder facilement suivant les conditions de pH. Nous avons donc décidé d'évaluer les potentialités de la biocatalyse pour effectuer la lipophilisation des acides chlorogéniques. Tout d'abord, l'aptitude de la lipase de *Candida antarctica* à catalyser les réactions d'estérification des acides phénoliques de café vert a été évaluée en utilisant des alcools gras de C4 à C18 (Figure 22). Menée en milieu fondu en présence d'un large excès d'alcool, sur les acides cinnamique, caféique, férulique et diméthoxycinnamique, les diverses réactions ont montré que la lipase était capable de catalyser la réaction à la condition que l'acide substrat ne présente pas un cycle aromatique para-hydroxylé. En effet, tandis que les acides cinnamique et 3,4-Diméthoxycinnamique étaient estérifiés avec des rendements très satisfaisants, aucune estérification n'a été observée avec les acides caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) et férulique (4-hydroxy-3-méthoxycinnamique). De plus, nous avons également observé qu'en la présence d'une chaîne saturée sur l'acide phénolique, l'hydroxylation en para du cycle aromatique n'avait aucun effet sur l'activité catalytique de l'enzyme. Ainsi, il est probable que la présence sur cette chaîne d'une insaturation conjuguée avec le cycle comportant un groupe para hydroxylé conduit à une inhibition complète de l'enzyme.

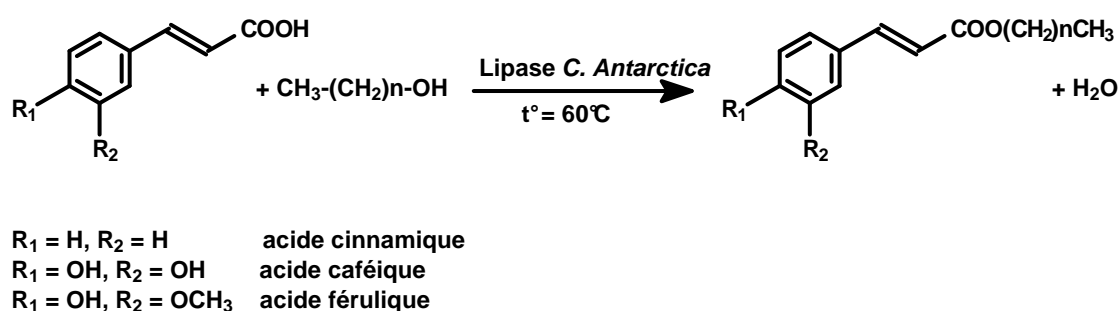


Figure 22 : Estérification enzymatique des acides phénoliques de café vert

Ces travaux ont ensuite été étendus à l'estérification enzymatique des acides chlorogéniques (Guyot *et al.*, 2000). Nous avons étudié l'estérification biocatalysée par la lipase précédemment citée (Figure 23) de l'acide 5-cafféoyl quinique avec différents alcools

gras. En milieu fondu, la réaction est possible et sa cinétique dépend de la longueur de chaîne de l'alcool gras. Malheureusement, là encore la réaction sans solvant, bien qu'avantageuse, s'avère beaucoup trop lente. En utilisant le 2-méthyl 2-butanol comme solvant, la réaction conduit à de meilleurs rendements avec des cinétiques plus adaptées. A la date de rédaction de ce mémoire, les propriétés biologiques de ces esters d'acides chlorogéniques synthétisés étaient en cours d'évaluation.

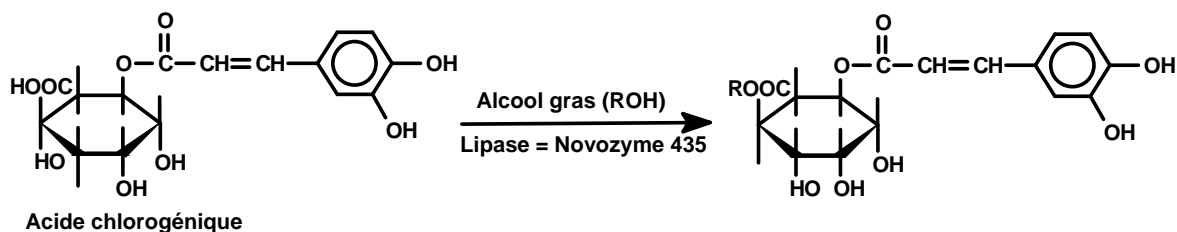


Figure 23 : Synthèse enzymatique d'esters gras d'acides chlorogéniques :
exemple de l'acide 5-cafeoyl quinique

VI - Conclusion

Les exemples de ce chapitre illustrant les potentialités de la lipophilisation enzymatique de biomolécules montrent que les lipases peuvent être utilisées dans de multiples réactions impliquant des substrats très divers. En raison de leur sélectivité d'action et de leur capacité à opérer dans des conditions douces de températures et de pressions, leur utilisation offre bien souvent de nombreux avantages par rapport aux catalyseurs chimiques. En plus de leur utilisation plus classique dans le domaine du biofaçonnement des corps gras, nous avons mis en exergue ici que ces enzymes se révélaient être tout aussi efficaces pour catalyser des réactions d'hydrophobation de substrats très hydrophiles tels que les sucres, les acides aminés et leur dérivés et même les molécules complexes de type polyphénols et acides phénoliques. Bien entendu, un travail encore conséquent reste à réaliser pour améliorer ces procédés enzymatiques de lipophilisation notamment au niveau des rendements et des cinétiques des réactions testées. De plus, il est certain que le passage de l'échelle du laboratoire aux échelles pilote puis industrielle ne sera pas des plus aisés. Néanmoins, nous sommes convaincus que la lipophilisation enzymatique devrait conduire, dans un futur proche, à la synthèse de nouvelles biomolécules multifonctionnelles combinant par exemple des propriétés émulsifiantes, antimicrobiennes et antioxydantes et trouvant de nombreuses applications dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

CHAPITRE 4

SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE

CHIMIE DES LIPIDES

Ce dernier chapitre couvre des projets de recherche menés dans les différentes équipes dont j'ai fait partie et qui ne concernent pas directement le biofaçonnement des corps gras ou la lipophilisation enzymatique de biomolécules. Il s'agit d'études exécutées ponctuellement sur une durée plus ou moins longue et que je choisis de regrouper ici sous la dénomination « chimie des lipides ».

Seront donc traités dans ce chapitre :

- L'obtention par voie enzymatique de dérivés lipidiques du type esters de glycérol et d'acides dicarboxyliques ou de type esters de stérols.
- L'étude d'antioxydants naturels, en particulier les lécithines, pour limiter l'oxydation dans des matrices alimentaires produites à partir d'huiles insaturées.
- Dans un cadre d'un projet franco-brésilien sur la relance de la culture du ricin au Brésil, la réévaluation du procédé de déshydratation de cette huile pour optimiser la production d'acides gras particuliers.

I - Obtention par voie enzymatique de dérivés lipidiques

I-1 Esters de glycérols et d'acides dicarboxyliques (Travaux réalisés à l'US Department of Agriculture, Philadelphia, 1996)

*(Cette section a fait l'objet d'une publication : **Synthesis of polyfunctional glycerol esters: lipase-catalyzed esterification of glycerol with diesters.** Villeneuve P., Foglia T.A., Mangos T.J., Nunez A., J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 1545-1549, 1998. Article référencé n°12.)*

L'estérification enzymatique d'acides dicarboxyliques avec des diols a été largement étudiée pour la production de précurseurs de biopolymères biodégradables (Binns *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1996 ; Linko *et al.*, 1995). Nous avons donc estimé que l'estérification enzymatique du glycérol avec des diacides pouvait conduire à des dérivés du glycérol mono ou diestérifiés susceptibles d'être ensuite utilisés comme synthons trifonctionnels pour la production de biopolymères ou de tensioactifs glycéroliques. Il est connu que de tels glycérides partiels peuvent être obtenus par voie chimique ou enzymatique (Bornscheuer, 1995). Leur synthèse chimique s'effectue à l'aide de catalyseurs inorganiques à des

températures et des pressions élevées mais les rendements sont généralement insuffisants et des produits secondaires de décomposition peuvent être également formés. La synthèse enzymatique apparaît plus avantageuse, puisque l'utilisation d'un biocatalyseur lipasique permet de travailler dans des conditions plus douces.

Pour la synthèse de glycérides partiels, trois stratégies peuvent être considérées : hydrolyse partielle de triacylglycérols (TAG), glycérolyse de TAG et estérification directe de glycérol. Concernant notre étude dans laquelle intervenaient des acides dicarboxyliques, seule l'estérification directe pouvait être envisagée. Cependant, son inconvénient majeur réside dans le fait qu'il faut faire réagir deux substrats de solubilités très différentes. Ainsi il est souvent nécessaire de recourir à des méthodes où l'obstacle de la solubilité du glycérol en particulier est surmonté soit par adsorption sur support inerte, soit par utilisation d'un groupement protecteur de type isopropylidène, soit enfin par l'addition d'un agent complexant de type acide phényl boronique. D'autre part, la mise en œuvre de milieux biphasiques émulsionnés ou l'ajout de micro quantités d'eau peuvent être également envisagés de manière à faciliter le contact à l'interface entre les deux substrats et l'enzyme.

Nous avons donc décidé dans le cadre de cette étude d'évaluer et comparer l'intérêt de ces stratégies pour la synthèse de mono et diesters adipique ou sébacique du glycérol en utilisant la lipase 1,3 régiosélective de *Mucor miehei* (Lipozyme IM60, Société Novo-Nordisk) L'ensemble des résultats obtenus est mentionné dans le tableau 7. Il va de soit que l'estérification directe du glycérol en milieu fondu est la méthode la plus attrayante ; néanmoins, quelles que soient les conditions réactionnelles employées, la formation des esters désirés était minimale (max 4%). Concernant l'utilisation de l'isopropylidène glycérol pour le greffage du diacide puis l'hydrolyse du produit correspondant, elle permet d'obtenir en rendement pratiquement quantitatif le glycérol monosébacate (ou adipate). Bien entendu, l'inconvénient de la méthode réside dans le fait que deux étapes sont nécessaires pour obtenir l'ester désiré. Quant à l'adsorption préalable du glycérol sur un support inerte de type silice afin de favoriser le contact avec les deux substrats, nous avons constaté que la formation du mono ester de glycérol n'excédait pas 35% alors que le diester n'était pas formé dans les conditions opératoires choisies.

Méthode	Nature du donneur d'acyle et conditions réactionnelles	Résultats
Isopropylidène glycérol	Dimethyl adipate ou sébacate ratio molaire ester/glycérol 2:1, 60°C, 10% d'enzyme, pression réduite	Rendement quantitatif
Adsorption du glycérol sur silice	Dimethyl sébacate ratio molaire ester/glycérol 2:1, 60°C, 10% d'enzyme, pression réduite	Formation de glycérol monosébacate = 35%
Agent complexant acide phényl boronique	Dimethyl sébacate ratio molaire ester/glycérol 2:1, 60°C, 10% d'enzyme, solvant =hexane	Très faible formation de mono ester (4%)
Estérification directe du glycérol	Dimethyl sébacate ou acide sébacique ratio molaire ester(acide)/glycérol 2:1, 60°C, 10% d'enzyme, pression réduite	Très faible formation de mono ester (4%)
Système biphasique	Dimethyl sébacate ou acide sébacique ratio molaire ester(acide)/glycérol 2:1, 60°C, 10% d'enzyme, solvant Chloroforme/eau 50 :50 : v/v	Faible formation de mono ester (10%)
Addition de faibles quantités d'eau (4%) pour estérification directe du glycérol	Dimethyl sébacate ratio molaire ester (acide)/glycérol 2:1, 40°C, 10% d'enzyme, pression réduite)	Formation de glycérol mono-sébacate (70%) + formation de glycérol di-sébacate (10%)

Tableau 7 : Méthodes d'estérification du glycérol avec des acides dicarboxyliques catalysées par la lipase de *Mucor miehei*

L'addition d'acide phényl boronique au milieu réactionnel afin de former un complexe actif avec le glycérol n'a, quant à elle, donné absolument aucun résultat inhibiteur de cet additif sur l'enzyme utilisée. Nous nous sommes orientés alors vers l'utilisation de milieux biphasiques espérant alors que la biocatalyse à l'interface permettrait l'obtention des esters désirés. Là encore, les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants. Pour finir, nous avons choisi de travailler en milieu fondu dans lequel le donneur d'acyles joue à la fois le rôle de substrat et de solvant et en ajoutant au milieu réactionnel une faible quantité d'eau afin de solubiliser partiellement le glycérol et créer ainsi une interface liquide-liquide favorisant la réaction de synthèse. Dans de telles conditions, le suivi de la réaction par GC-MS a montré que la formation des esters de glycérol et de diacides dépasse les 80% avec une forte prépondérance du monoester (Figure 24).

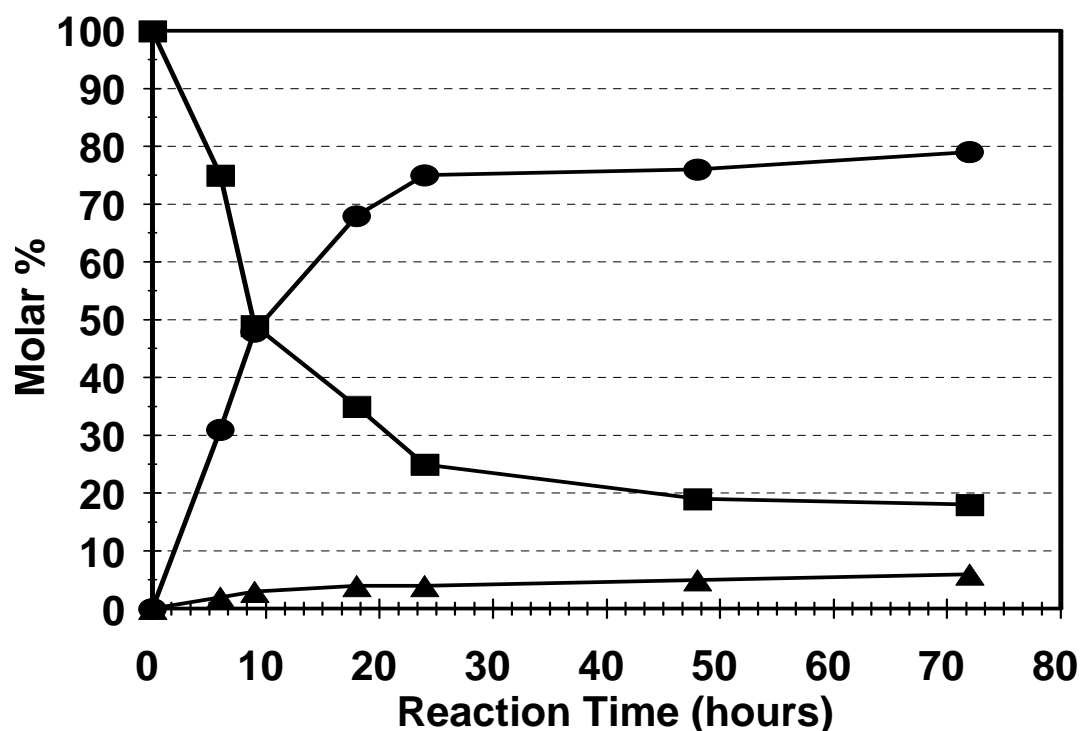


Figure 24 : Estérification du glycérol avec l'acide sébacique diméthyl ester en présence d'eau (4% w/w).

Conditions : ratio molaire ester/glycérol 2:1, T=40°C, Lipozyme IM60 (10% p/p/w) Pression réduite Glycérol (■) ; Glycérol monosébacate méthyl ester (●) ; glycérol disébacate méthyl ester (▲)

Par ailleurs, nous avons également étudié l'influence de la quantité d'eau ajoutée et montré que l'optimum de synthèse correspondait à un ajout de 4% alors que des quantités supérieures d'eau conduisaient à la formation des produits attendus en plus faibles proportions puisque dans ce cas, la réaction inverse d'hydrolyse se trouvait être favorisée (Figure 25).

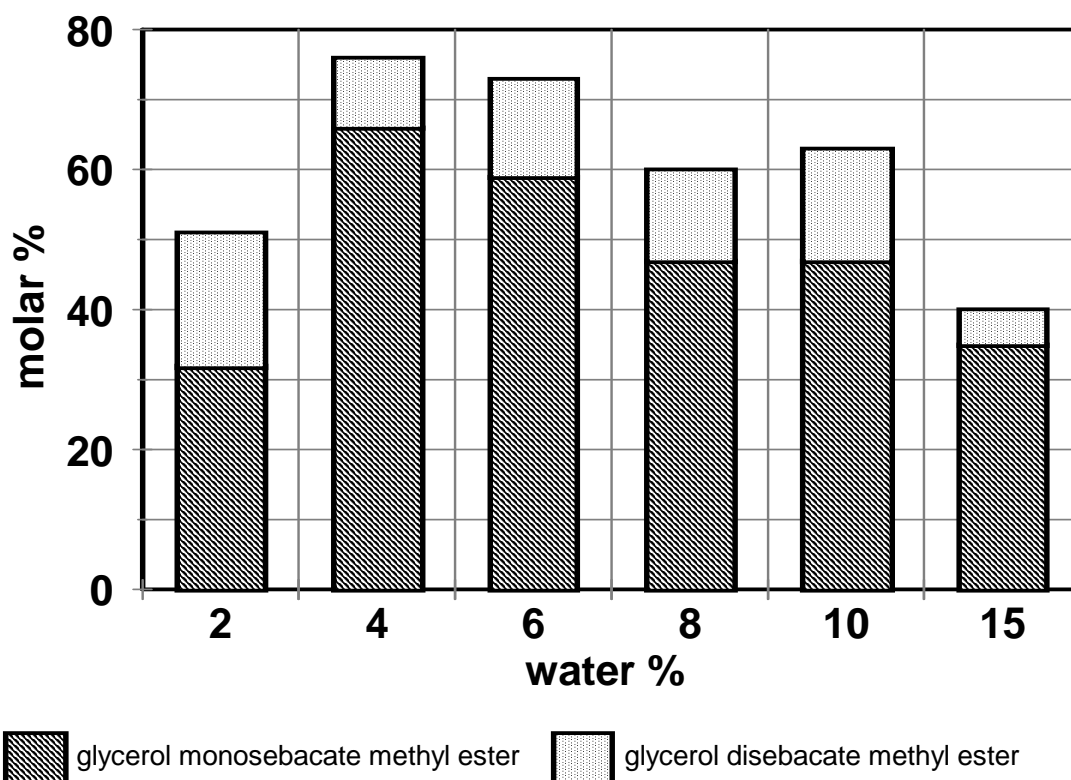


Figure 25 : Influence de la quantité d'eau ajoutée au milieu réactionnel sur l'estérification du glycérol par l'acide sébacique diméthyl ester.

(ratio molaire Ester/glycérol 2:1, $t=40^{\circ}\text{C}$, Lipozyme IM60 (10% w/w), pression réduite).

I-2 Esters de phytostérols (Travaux réalisés au CIRAD, 2002)

*(Cette section a fait l'objet d'une publication en cours de rédaction : **A comparison of lipase-catalyzed reaction versus chemical catalysis for the synthesis of phytosterols fatty esters.** Villeneuve P., Turon F., Caro Y., Barea B., Pina M., Figueroa-Espinoza M., Lago R., Graille J., J. Am.Oil Chem.Soc.. Article non référencé.)*

L'effet hypocholestérolémiant des phytostérols est connu depuis longtemps (Beveridge *et al.*, 1964 ; Lees *et al.*, 1977 ; Heinemann *et al.*, 1986). Cependant, le manque de solubilité des préparations de phytostérols et de phytostanols limite leur utilisation en agroalimentaire. Or dans les années 90, il a été montré que l'estérification du sitostérol par des acides gras provenant d'huiles végétales, telles que l'huile de colza, augmente sa solubilité dans les graisses alimentaires. En parallèle, une étude de 1998 a démontré que des esters de sitostanol incorporés dans une margarine peuvent provoquer une diminution du cholestérol total et du LDL-cholestérol d'environ 10% chez des patients présentant une

hypercholestérolémie modérée (Weststrate *et al.*, 1998). De même, des travaux récents concluent que les esters de stérols et de stanols diminuent de façon similaire le cholestérol total et le LDL-cholestérol dans le plasma en diminuant l'absorption intestinale du cholestérol (Jones *et al.*, 2000). A ce jour, deux margarines sont commercialement disponibles, une avec des esters de phytostérols (Pro-Activ produite par Unilever et disponible en France depuis septembre 2000), et une avec des esters de stanols (Johnson & Johnson). Leur efficacité sur la diminution du LDL-cholestérol est identique.

Nous avons estimé qu'il serait avantageux de produire des esters de phytostérols en estérifiant la fraction stérolique d'huile végétale (colza) par des acides gras n-3 d'une huile de poisson (Figure 26). Les produits ainsi synthétisés seraient doublement avantageux puisque cumulant les effets bénéfiques des stérols avec ceux des acides gras polyinsaturés. Ils pourraient donc trouver des applications dans les domaines des aliments.

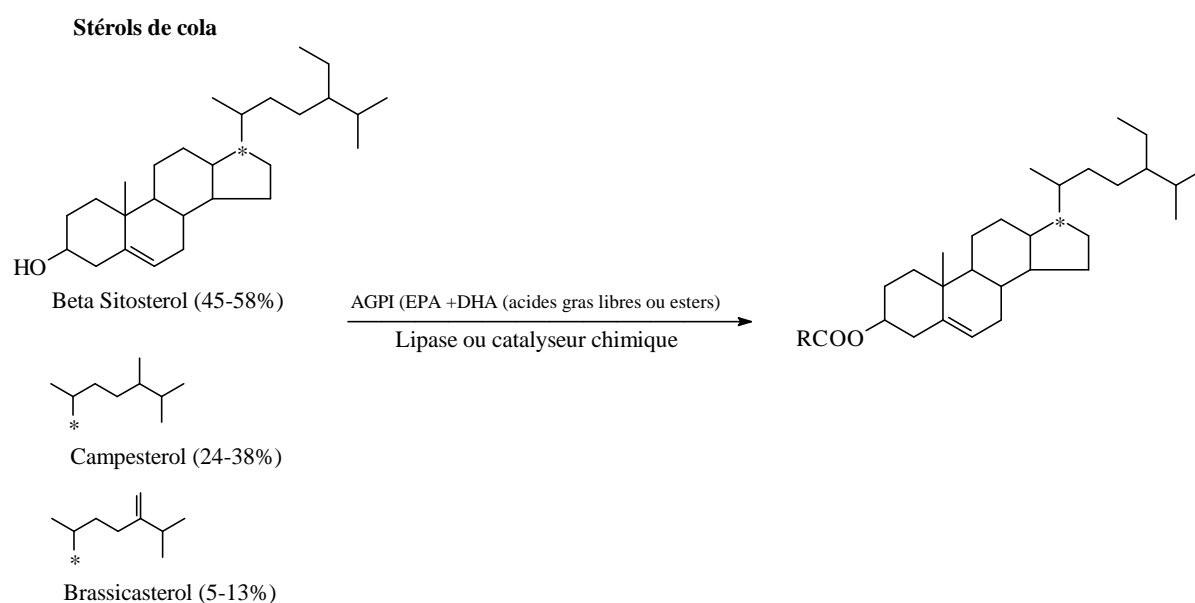


Figure 26 : Synthèse d'esters de phytostérols et d'acides gras polyinsaturés

Nous avons comparé pour cette synthèse les catalyses chimique et enzymatique. Concernant la première, la réaction menée avec le NaHSO_4 est rapide et conduit à une disparition *quasi* complète des stérols de colza en 24 heures de réaction. Cependant, la formation des esters de stérols désirés n'atteint que 66,8%. En effet, nous constatons une réaction secondaire importante correspondant vraisemblablement soit à la formation d'oxystérols, (dérivés oxydés des phytostérols connus pour leur toxicité), soit à des produits de déshydratation des phytostérols.

Concernant la voie biocatalytique, si la synthèse enzymatique de TAG à partir de glycérol et d'acides gras a largement été étudiée, l'estérification des stérols avec des acides gras poly-insaturés est plus nouvelle et donc peu documentée. Citons à titre d'exemple, les travaux de Shimada *et al.* (1999) qui ont utilisé la lipase de *Pseudomonas* sp. pour estérifier le cholestérol avec du DHA avec un rendement proche de 90%.

Les techniques de chromatographies planaires (CP) sont parfaitement adaptées pour sélectionner la meilleure lipase pour cette catalyse (Figure 27).



Figure 27 : Suivi en chromatographie planaire de la synthèse enzymatique d'esters de stérols.

(les pistes de gauche à droite correspondent respectivement à : 1 : témoin sans enzyme, 2 : papaïne, 3 : papaïne Sigma, 4 : lipase ricin, 5 : Novozyme, 6 : Lipozyme, 7 : lipase *Candida rugosa*, 8 : témoin ester de stérol.

Eluant : hexane/diether éthylique/acide acétique 90/10/1 v/v)

Ainsi, des réactions de screening rapide des différentes enzymes lipolytiques nous ont permis de sélectionner la lipase de *Candida rugosa* pour la suite de cette étude. En effet seule cette dernière montre une bonne aptitude à réaliser cette réaction. Les autres lipases ne se sont pas avérées efficaces pour catalyser cette réaction dans ces conditions. En effet, les traces d'esters de phytostérols observées ne sont pas dues à une activité catalytique de l'enzyme mais à une estérification thermique spontanée. Notons que dans un but de trouver un nouvel exemple de valorisation des lipases végétales (cf Chapitre 2) nous avons tenté en vain d'optimiser la catalyse avec la papaïne ou la lipase extraite du tourteau de ricin mais aucun des résultats obtenus n'a conduit à une synthèse efficace des esters de stérols par l'action catalytique de ces deux enzymes.

Par conséquent, en ciblant exclusivement nos travaux sur la lipase de *Candida rugosa*, nous avons étudié l'influence de divers paramètres réactionnels sur la formation des esters de phytostérols. Ainsi, la nature du donneur d'acyles joue un rôle prépondérant. Lorsque les acides gras sont utilisés sous leur forme libre en estérification directe, la formation des esters atteint les 70% alors que lorsque leurs esters méthyliques sont employés la formation des produits attendus n'excède pas les 5%. Ce faible résultat pourrait être dû à l'inhibition de l'enzyme par le méthanol dégagé au cours de la catalyse. En effet, la réaction se déroulant en milieu fermé, le méthanol généré n'est pas éliminé. Il se pourrait alors que ce dernier, à la manière de l'acétone, entre en compétition avec les molécules d'enzyme pour établir des liaisons hydrogènes avec l'eau présente dans le milieu. Ainsi, les molécules d'eau, piégées par le méthanol, ne sont plus disponibles pour maintenir la couche d'hydratation indispensable à la structure tridimensionnelle de l'enzyme alors désactivée.

Par ailleurs, nous avons pu optimiser la réaction quant au ratio molaire optimal des deux substrats à la température de réaction et la quantité d'enzymes à mettre en oeuvre.

Pour conclure, Si la température élevée de la réaction chimique permet d'utiliser les phytostérols à l'état fondu ce qui évite l'utilisation de solvant, elle semble rédhibitoire du fait de la déshydratation ou de la formation des oxystérols qu'elle génère. De ce point de vue, la réaction enzymatique montre sa plus grande efficacité en pouvant être réalisée à seulement 35°C, limitant au maximum à la fois tous les phénomènes d'oxydation ou de déshydratation, mais aussi les coûts énergétiques. Elle permet en un temps raisonnable, et en utilisant une faible quantité d'enzyme, d'obtenir un rendement proche de 80%. Ainsi, la biocatalyse permet d'accéder aux esters poly-insaturés de phytostérols, molécules à hautes valeurs ajoutées en raison de leurs propriétés hypocholestérolémiantes et de l'effet nutritionnel bénéfique de la chaîne n-3.

II - Étude d'antioxydants naturels pour limiter l'oxydation de matières grasses insaturées de produits céréaliers de cuisson (Travaux réalisés au Centre de R et D, Danone Vitapole, Groupe Danone, 1999-2001)

(Cette partie a fait l'objet d'une publication : **Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols**. Judde A., Villeneuve P., Rossignol-Castera A., Le Guillou A., J. Am. Oil Chem. Soc., accepté. Article référencé n°26.)

II - 1 Principe et mécanisme de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides est un phénomène qui se déclenche au contact de l'oxygène et en présence d'initiateurs. Ces derniers sont :

- La température : Plus la température est élevée, plus rapide est l'oxydation. On considère par exemple qu'entre 50 et 110°C la cinétique d'oxydation peut être multipliée par deux ou trois à chaque fois que l'on augmente la température de 10°C
- La lumière (et en particulier UV) est initiatrice de l'oxydation
- Les ions métalliques : Des traces d'ions métalliques en particulier le cuivre et le fer à l'échelle du ppm peuvent initier l'oxydation des lipides. Par exemple, 0.1ppm de cuivre ou 1.0 ppm de fer suffisent à réduire de moitié la stabilité oxydative de la matière grasse concernée
- Les pigments sensibilisateurs : La présence de molécules photosensibles tels que certains pigments favorise la cinétique d'oxydation en initiant par leur dégradation la formation d'oxygène singulet, molécule responsable de l'oxydation photochimique
- Les traces de radicaux pro-oxydants : Certaines molécules organiques ou inorganiques comme par exemple des radicaux libres accélèrent la cinétique d'oxydation

Cette réaction génère la formation de molécules volatiles de type esters, aldéhydes, alcools cétones et lactones. Elles engendrent alors un fort défaut organoleptique dans les produits finis. Parmi ces molécules, les aldéhydes insaturés et les cétones présentent les seuils de détection les plus bas et sont par conséquent les principaux responsables de l'apparition du goût de rance.

L'oxydation des lipides est une combinaison de réactions impliquant l'oxygène triplet et l'oxygène singulet. Celle avec l'oxygène triplet a été largement étudiée. Cependant, il semble qu'elle n'explique pas à elle seule l'étape d'initiation de l'oxydation. En effet, il a été

suggéré que l'oxygène singulet serait responsable de cette étape en raison du fait que ce dernier peut réagir directement sur les doubles liaisons des acides gras sans formation de radicaux libres. De plus, sa réaction avec l'acide linoléique serait environ mille cinq cents fois plus rapide que pour l'oxygène triplet. L'oxygène singulet est principalement généré par la lumière par une réaction photochimique. Cette dernière a un impact considérable sur l'oxydation des huiles contenant des molécules photosensibles telles que la chlorophylle dont les produits de dégradation favorisent la formation de l'oxygène singulet.

II-1-1 Réaction avec l'oxygène triplet

La réaction de l'oxygène triplet est communément appelée auto-oxydation. Elle constitue le mécanisme prépondérant de l'oxydation des lipides C'est une réaction radicalaire générant des hydroperoxydes et des composés volatils et qui peut être décomposée en trois phases : initiation, propagation et terminaison (Figure 28).

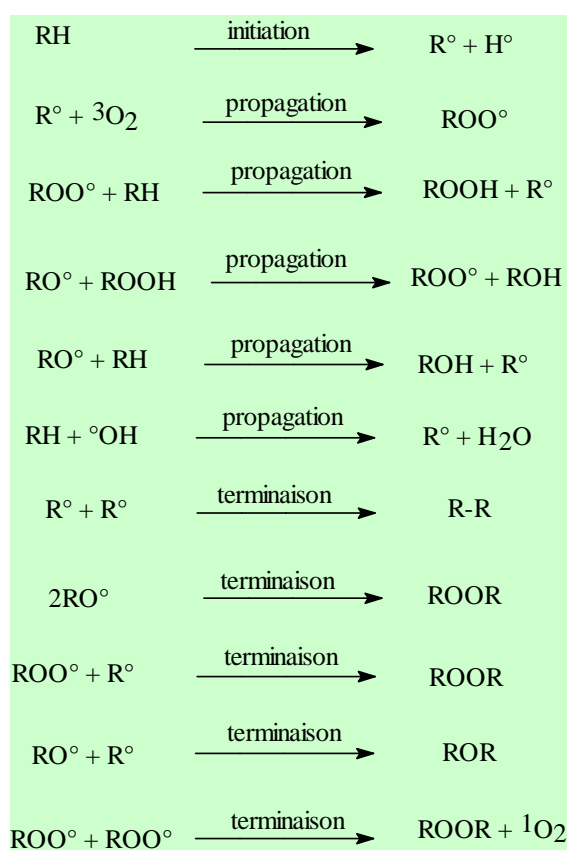


Figure 28 : Réactions radicalaires impliquées dans l'oxydation lipidique

- Initiation : La phase d'initiation également appelée période d'induction peut être décrite comme étant la période durant laquelle le processus d'oxydation est encore lent. A la fin de cette phase, l'oxydation s'accélère brutalement, la consommation d'oxygène est importante et la valeur d'indice de peroxydes augmente significativement. D'un point de vue chimique, cette phase correspond à la rupture homolytique d'un hydrogène adjacent à une double liaison d'une chaîne d'acide gras (RH). Il en découle la formation d'un radical libre R^\bullet .
- Propagation : Le composé radicalaire formé lors de l'étape d'initiation réagit ici très rapidement avec l'oxygène triplet pour générer d'autres espèces radicalaires qui elles-mêmes réagissent entre elles pour former de nouveaux radicaux libres. La réaction se propage donc à une vitesse importante. A ce stade, la formation de peroxydes s'accélère. Il s'agit d'une réaction irréversible qui atteint rapidement un maximum. Il est à noter que l'addition d'un antioxydant à ce stade de l'oxydation n'aura pratiquement aucun effet puisque le produit a déjà atteint son stade de rancissement.
- Terminaison : Quand les peroxydes atteignent un maximum, la phase de terminaison commence. Il ne se forme plus de radicaux et les peroxydes sont alors transformés en composés volatils de type aldéhydes, cétones et acides. Par ailleurs, des composés secondaires non volatils sont également formés tels que triglycérides oxydés et leurs polymères, acides oxydés et constituants mineurs oxydés (ex : oxystérols). La décomposition des composés primaires d'oxydation est un mécanisme complexe dans lequel un seul hydroperoxyde peut résulter en la formation de plusieurs molécules volatiles.

La nature des produits secondaires obtenus après oxydation d'une huile ou d'un corps gras est influencée par la composition en hydroperoxydes et le type de rupture des doubles liaisons des acides gras. La plupart des molécules du type hydrocarbures, alcools, furannes, aldéhydes, cétones et acides génèrent un goût de rance. Les seuils de détection suivant le type de molécules sont différents (Tableau 8). Ainsi les hydrocarbures ont les valeurs les plus élevées (90-2150 ppm) ce qui implique que ces molécules sont vraisemblablement peu responsables de la perception du défaut organoleptique dans le produit fini. En revanche, les dérivés carbonyles tels que les alkanals, alkadienals et vinyl cétones ont des seuils de détection excessivement bas.

II-1-2 Réaction avec l'oxygène singulet

L'oxydation des acides gras insaturés est accélérée par exposition à la lumière. On parle alors de photo-oxydation. Cette réaction est due à la présence de radicaux libres produits par l'irradiation à la lumière UV qui catalyse la décomposition des hydroperoxydes, des composés carbonylés et d'autres molécules oxydées. Le mécanisme de ce type d'oxydation correspond à une réaction radicalaire classique. Bien que l'oxydation due à la réaction avec l'oxygène triplet soit le principal mécanisme de l'oxydation des lipides, la photo-oxydation ne doit pas être négligée pour autant en raison de son rôle prépondérant dans la phase d'initiation. Cette réaction photochimique résulte de l'interaction entre la lumière et une molécule photosensible en présence d'oxygène. Les pigments en particulier peuvent servir de photosensibilisateurs en absorbant la lumière pour atteindre un état excité qui peut être du type singulet ou triplet, ce dernier ayant le temps de vie le plus long. Ces deux types de molécules photosensibles peuvent intervenir suivant deux mécanismes. Dans le premier, les photosensibilisateurs interviennent en tant qu'initiateurs de radicaux libres en réagissant dans leur état triplet directement avec les lipides pour former des espèces radicalaires. Les hydroperoxydes néoformés sont alors les mêmes que dans le cas de l'auto-oxydation. Cependant, contrairement à cette dernière réaction, la photo-oxydation ne peut pas être inhibée par les antioxydants antiradicalaires. Dans le second mécanisme, la molécule photosensible dans son état triple, interagit avec l'oxygène triplet pour donner l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui réagit alors avec les lipides. Ce type de réaction ne peut pas être inhibé par les antioxydants destructeurs de radicaux. L'oxygène singulet réagit avec l'acide linoléique à une vitesse 1500 fois plus élevée que celle de l'autooxydation impliquant l'oxygène triplet. En raison de cette très haute réactivité, les hydroperoxydes formés par l'oxygène singulet jouent un rôle prépondérant dans la phase d'initiation de l'oxydation radicalaire.

II-1-3 Oxydation enzymatique

Ce type d'oxydation est lié à la présence dans certains ingrédients d'enzymes oxydantes appelées lipoxygénases. Elles catalysent la transformation d'acides gras insaturés en hydroperoxydes. On les trouve dans certaines céréales et en abondance dans le soja. Ces enzymes contiennent un atome de fer dans leur site actif. Elles sont activées par les hydroperoxydes et le fer II est oxydé en fer III dans un mécanisme au cours duquel le radical pentadiène de l'acide linoléique par exemple se lie à l'enzyme, réagit avec l'oxygène et le radical peroxy formé est alors réduit par l'enzyme pour produire un hydroperoxyde.

II - 2 Prévention de l'oxydation : nature et mécanisme d'action des antioxydants

La Figure 29 représente la cinétique de la réaction d'oxydation avec ses trois phases distinctes.

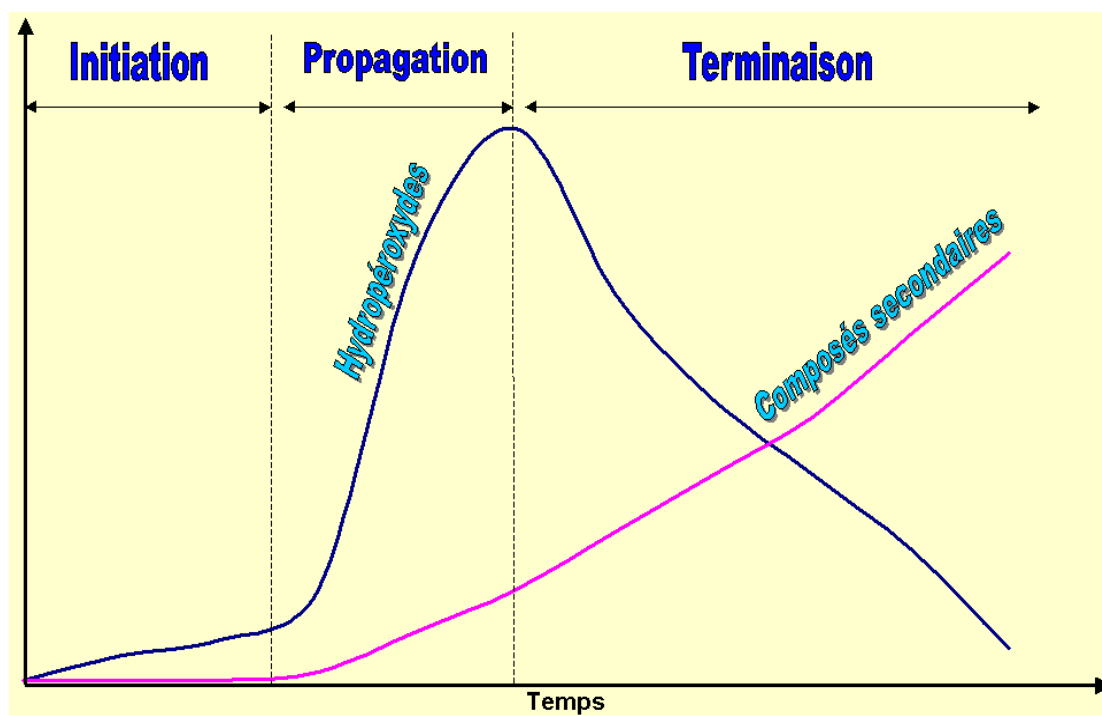


Figure 29 : Cinétique de la réaction d'oxydation

Puisqu'il n'est pas possible d'éviter l'oxydation (on ne peut simplement que la retarder), la prévention de la détérioration oxydative de tout produit alimentaire consiste à maîtriser la phase d'initiation de manière à la rendre au moins égale à la DLUO du produit.

Pour combattre l'oxydation, l'utilisation d'un antioxydant s'avère bien souvent nécessaire. L'étape décisive de l'oxydation correspond à la phase d'initiation au cours de laquelle les radicaux libres se forment. La formation de ces derniers peut être maîtrisée par les antioxydants, lesquels agissent en destructeurs de radicaux. Quand la concentration en antioxydants n'est plus optimale, la formation de radicaux prévaut et la consommation d'oxygène est accélérée.

II-2-1 Antioxydants antiradicalaires

Ce type d'antioxydants, appelés également antioxydants primaires, ralentit l'oxydation principalement lors de la phase d'initiation, mais également lors de la propagation. Ils ont pour cible les radicaux libres. Leur mécanisme d'action consiste à accepter un radical issu de l'oxydation d'un acide gras. Ces radicaux sont de type peroxy (ROO°) et alkoxy (RO°). Par l'action de l'antioxydant, ils sont alors retransformés en espèces inertes ROOH ou ROH tandis que l'antioxydant lui-même acquiert un état radicalaire.

L'efficacité d'un tel antioxydant est liée à sa faculté à donner un atome d'hydrogène. De ce fait, elle est tributaire de sa structure chimique (nombre de groupements OH, liaisons hydrogènes, etc...). Les composés phénoliques possèdent toutes les propriétés d'antioxydants antiradicalaires efficaces. Ils possèdent en effet un nombre important de groupements hydroxyles (OH) qui peuvent facilement libérer un atome d'hydrogène. De plus, une fois le radical détruit, ils se retrouvent eux-mêmes sous une forme radicalaire stabilisée par résonance de la structure phénolique.

Un grand nombre d'antioxydants utilisés en industrie agroalimentaire sont d'origine synthétique. Cependant, tous ne sont pas autorisés en Europe. Les plus courants sont le BHA (Butylated hydroxyanisole), le BHT (Butylated hydroxytoluène), le TBHQ (Tertiary butylhydroxyquinone) et les gallates (propyl, octyl ou dodecyl) (Figure 9).

La vitamine C (ou L- acide ascorbique) est également utilisée en tant qu'antioxydant bien souvent sous sa forme synthétique, ester d'acide palmitique. Outre son action antiradicalaire, elle peut aussi agir en tant que synergiste de certains antioxydants et notamment les tocophérols. L'acide ascorbique peut également être considéré comme un réducteur d'oxygène.

De nombreuses recherches existent au sujet de la détection de molécules antioxydantes dans différentes espèces végétales. Les sources de tels antioxydants sont multiples et variées. Ces composés peuvent être des polyphénols, des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Figure 30), des anthocyanidines et des flavonoides (Figure 31).

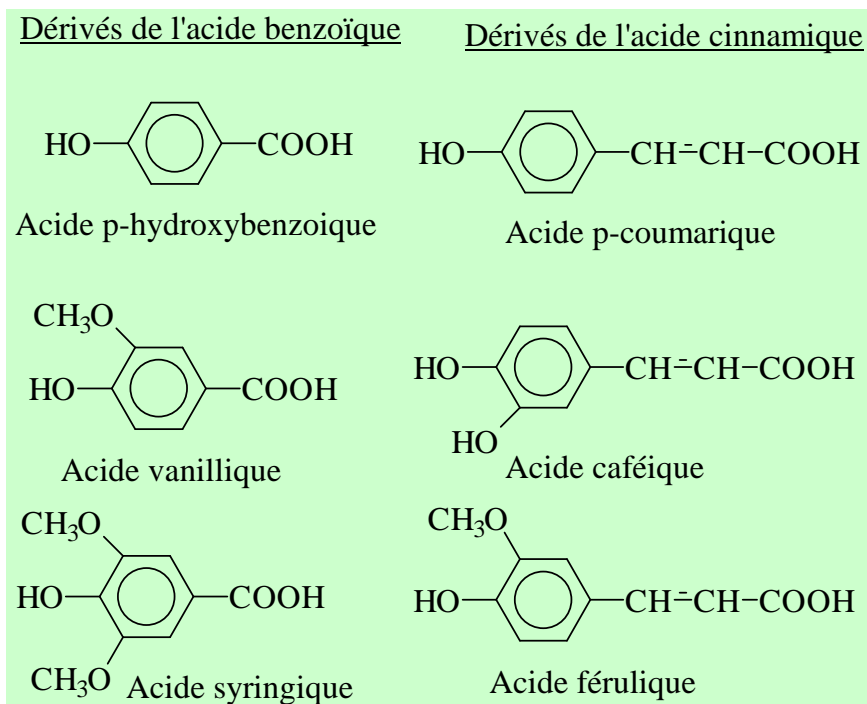


Figure 30 : Structure des acides phénoliques

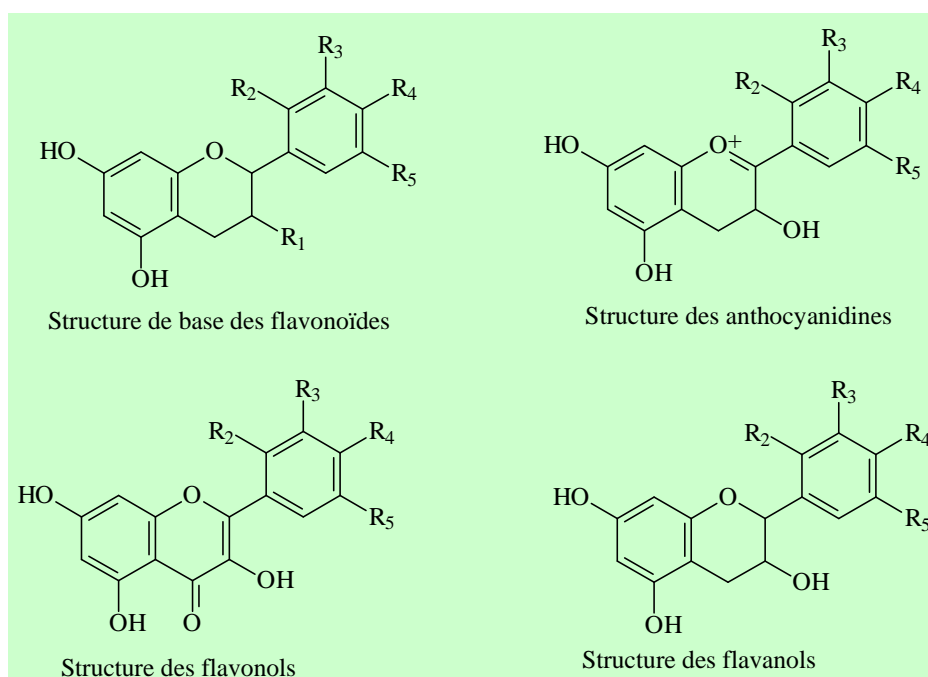


Figure 31: Structure des flavonoides et anthocyanidines

L'activité antioxydante de ces différents composés est variable. Elle dépend de leur structure chimique et notamment du degré d'hydroxylation et de la position de ces groupements OH. Outre leur activité antiradicalaire, certaines de ces molécules peuvent également présenter des propriétés chélatrices de métaux pro-oxydants.

Les herbes et épices sont particulièrement riches en antioxydants. Les extraits de romarin par exemple sont largement disponibles commercialement. Leur activité antioxydante repose principalement sur la présence de deux molécules, acide carnosique et carnosol (Figure 32).

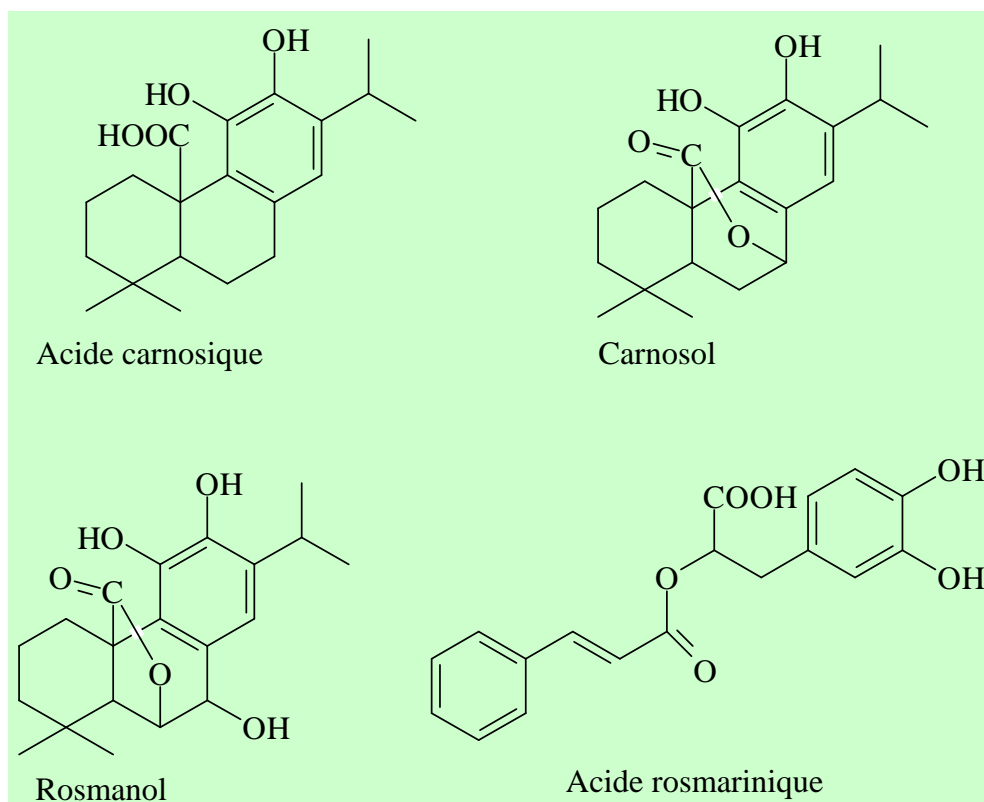


Figure 32 : Structure chimique des antioxydants présents dans le romarin

Dans le thé, substance végétale également reconnue pour ses propriétés antioxydantes on trouve surtout des catéchines et leurs dérivés gallates (Figure 33).

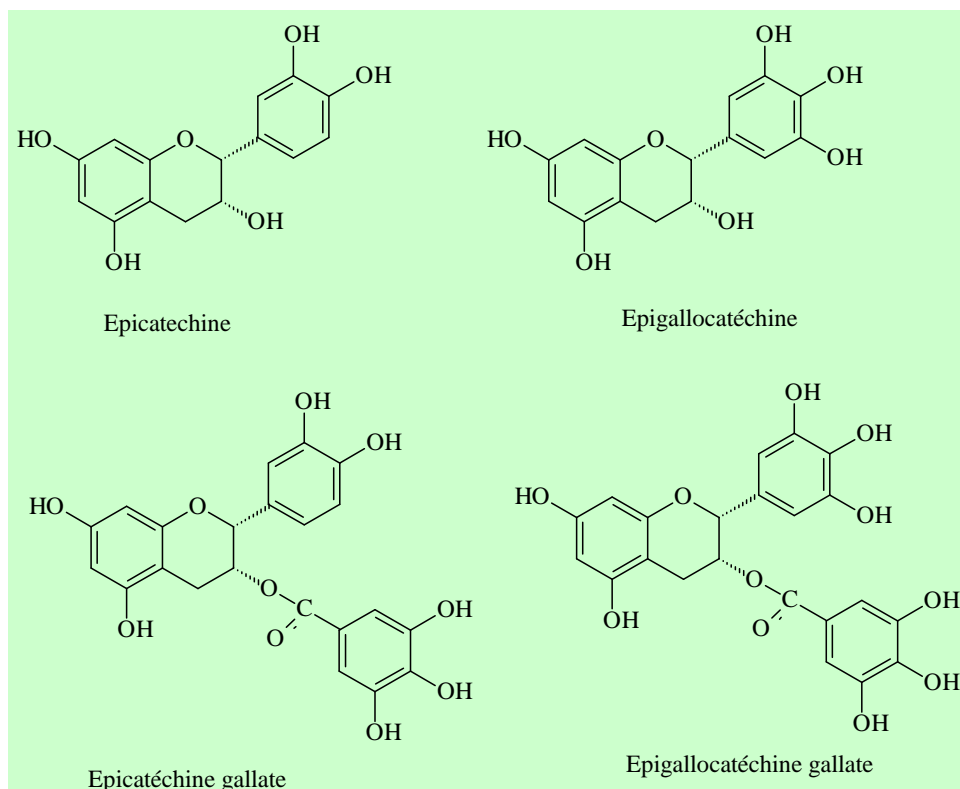


Figure 33 : Structure des antioxydants présents dans les extraits de thé

Les tocophérols et tocotriénols constituent également de puissants antioxydants antiradicaux. Ils sont présents dans différentes espèces mais en particulier dans les huiles végétales et constituent donc les antioxydants naturels de ces dernières. Seuls certains isomères (formes RRR) sont trouvés à l'état naturel. Lorsqu'ils sont d'origine synthétique, ils correspondent alors à des mélanges racémiques. Les tocotriénols sont moins communs que les tocophérols et on les trouve principalement dans l'huile de palme mais aussi dans celle de son de riz et dans certains légumes et céréales. Les tocotriénols sont souvent considérés comme des antioxydants plus efficaces que les tocophérols. Ces antioxydants agissent par interaction avec les radicaux peroxy qu'ils annihilent en se transformant en radical tocophéroxyl puis en tocophéryl quinone. Il est admis que ces antioxydants sont plus puissants sous leur forme gamma et delta, la forme alpha présentant, quant à elle, la moins bonne activité antioxydante.

II-2-2 Antioxydants chélateurs de métaux

Il a été vu que les métaux de transition (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, V, Zn, Al) correspondaient à des initiateurs de la réaction d'oxydation. Par conséquent les produits ayant la capacité à chélater peuvent s'avérer être attractifs pour limiter l'oxydation lipidique. Beaucoup de composés différents peuvent former des complexes avec les métaux, produisant

des changements dans les activités catalytiques. Les chélateurs qui présentent des propriétés antioxydantes agissent par l'un des mécanismes suivant :

- Occupation de tous les sites de coordination du métal
- Formation de complexes métalliques insolubles
- Gène stérique aux réactions métal/lipides
- Prévention du cycle rédox du métal

Les chélateurs de métaux les plus utilisés en industrie agroalimentaire contiennent plusieurs groupements carboxyliques comme l'EDTA et l'acide citrique. La plupart d'entre eux sont hydrosolubles mais l'acide citrique est quant à lui liposoluble ce qui favorise la chélation des métaux dans la phase huileuse. Parmi les chélateurs citons également les phospholipides et plus généralement les lécithines (Figure 34) sur lesquelles nous reviendrons dans ce chapitre.

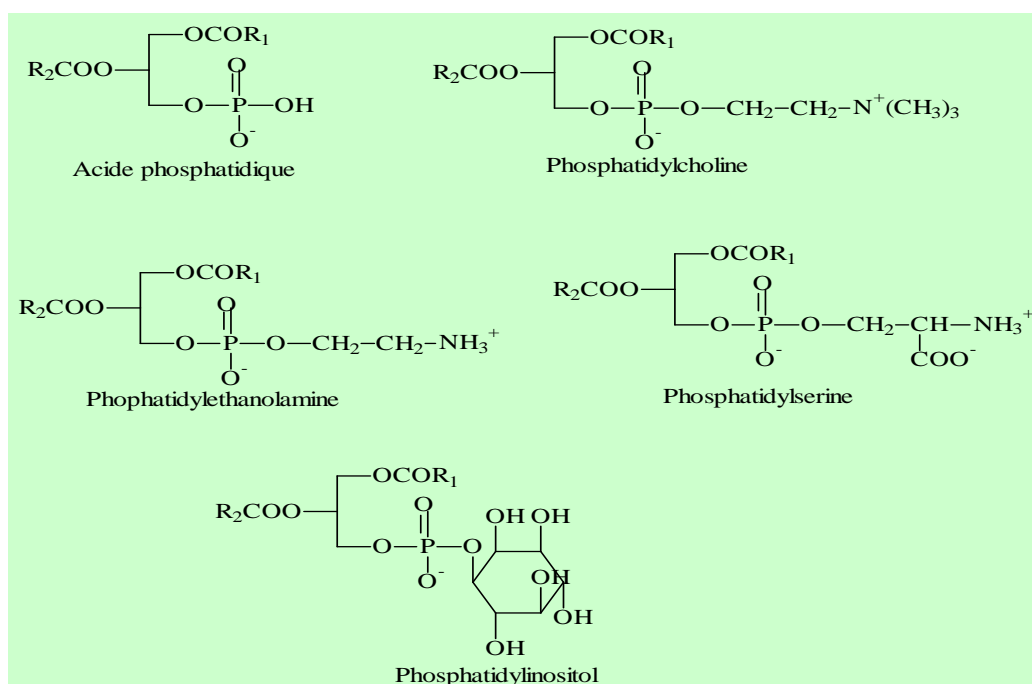


Figure 34 : Structure des phospholipides

II-2-3 Antioxydants désactivateurs de l'oxygène singulet

Le principal antioxydant appartenant à cette catégorie est le beta carotène, molécule appartenant à la famille des caroténoïdes. Ces composés sont des tetraterpènes à 40 atomes de carbone. Les carotènes constituent une classe de caroténoïdes correspondant à des

hydrocarbures polyéniques dont le nombre d'insaturations varie. Outre le beta carotène, citons également le lycopène que l'on trouve en abondance dans la tomate. Le beta carotène est le plus abondant des caroténoïdes pro vitamine A. Cet antioxydant en raison de sa coloration orange très prononcée est principalement utilisé en tant que colorant. Néanmoins, il joue le rôle d'antioxydant secondaire par son action désactivante de l'oxygène singulet.

On sait que l'oxygène singulet est instable et réagit facilement avec les lipides pour donner des radicaux libres. En présence de beta carotène, l'oxygène singulet transférera préférentiellement de l'énergie vers ce carotène. Le beta carotène acquiert alors un état triplet puis libère de la chaleur pour retrouver un état énergétique normal. Cependant, les caroténoïdes sont très instables et leur utilisation en tant qu'antioxydants est délicate. Le beta carotène est en effet très peu soluble dans la plupart des solvants et est très réactif. Sa stabilité est affectée par l'oxygène, la chaleur, le pH, la lumière et la présence de métaux.

II-2-4 Autres types d'antioxydants

Il existe d'autres actions antioxydantes plus marginales. Concernant l'activité des lipoxygénases, enzyme catalysant la formation de peroxydes à partir d'acides gras insaturés, il a été observé que certains acides phénoliques constituaient des inhibiteurs de ces enzymes en réduisant le fer présent dans leur site actif. De même, les glucose oxydases, les superoxide dismutases, les catalases et les glutathione peroxydases sont autant d'enzymes qui agissent sur l'oxydation soit en réduisant la quantité d'oxygène soit en agissant sur des espèces moléculaires oxydantes. Certains acides aminés et peptides et hydrolysats de protéines peuvent également avoir un rôle antioxydant, la plupart d'entre eux agissant en tant que chélateurs des métaux. Enfin, citons les produits de la réaction de Maillard. Ces derniers sont naturellement formés lors de l'étape de cuisson des produits alimentaires à des températures excédant 80°C. Ils proviennent de la réaction d'amines avec des sucres réducteurs. L'utilisation des produits de la réaction de Maillard en tant que source d'antioxydants a été largement étudiée, néanmoins la compréhension des mécanismes d'action et la connaissance de la nature des molécules impliquées sont encore incomplètes.

II-3 Étude de différents antioxydants naturels pour la protection des huiles insaturées : Cas de lécithines

Au cours de mes travaux dans le Centre de Recherche et Développement du groupe Danone, l'efficacité d'un nombre important d'antioxydants a été évaluée tant sur huile seule, qu'*in situ* au sein du produit céréalier. Pour des raisons de confidentialité, seront décrits uniquement les résultats obtenus avec les lécithines et qui ont été publiés sous la référence suivante :

(Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. Judde A., Villeneuve P., Rossignol-Castera A., Le Guillou A., J. Am. Oil Chem. Soc., accepté. Article référencé n°26.)

On nomme sous le terme de lécithines la fraction phospholipidique obtenue lors de l'étape de déémulsionnement du raffinage des huiles. Les lécithines standards obtenues ainsi, appelées également lécithines huileuses, correspondent en fait à un mélange de phospholipides de différentes natures (voir Figure 34), d'eau, de glucides, et autres lipides de type stérols, glycolipides et tocophérols. La répartition classique de ces différents composés dans une lécithine de soja huileuse est donnée dans la Figure 35. La fraction constituée des glucides, phospholipides et autres lipides est la partie insoluble à l'acétone. Le type de phospholipides varie suivant la nature de la lécithine (Tableau 8).

	Soja	Maïs	Tournesol	Colza	Oeuf
PC	21%	31%	14%	37%	69%
PE	22%	3%	24%	29%	24%
PI	19%	16%	13%	14%	
AP	10%	9%	7%		
PS	1%	1%			3%
Glyco	12%	30%	42%	20%	

PC=phosphatidylcholine; PE=phosphatidylethanolamine; PI=phosphatidylinositol

AP=acide phosphatidique, PS=phosphatidylsérine; Glyco=glycolipides

Tableau 8 : Composition des lécithines en phospholipides sur base déshuilée

Les phospholipides de la lécithine de colza contiennent plus de PC, PE et moins de PI et PA que la lécithine de soja. La lécithine d'œuf est très différente des lécithines végétales.

Elle ne contient ni PI ni PA mais est très riche en PC. Les principales sources de lécithines disponibles industriellement sont les lécithines de soja et d'oeuf. Les lécithines de tournesol et de colza sont bien moins développées. La raison en est que l'huile de soja brute est tout simplement l'huile végétale la plus riche en phospholipides.

Les lécithines sont normalement utilisées en tant qu'émulsifiants en industrie agroalimentaire. Néanmoins, différentes études ont mis en évidence leur rôle antioxydant (Zambiasi *et al.*, 1998 ; Pokorny *et al.*, 1990 ; Hamilton *et al.*, 1998).

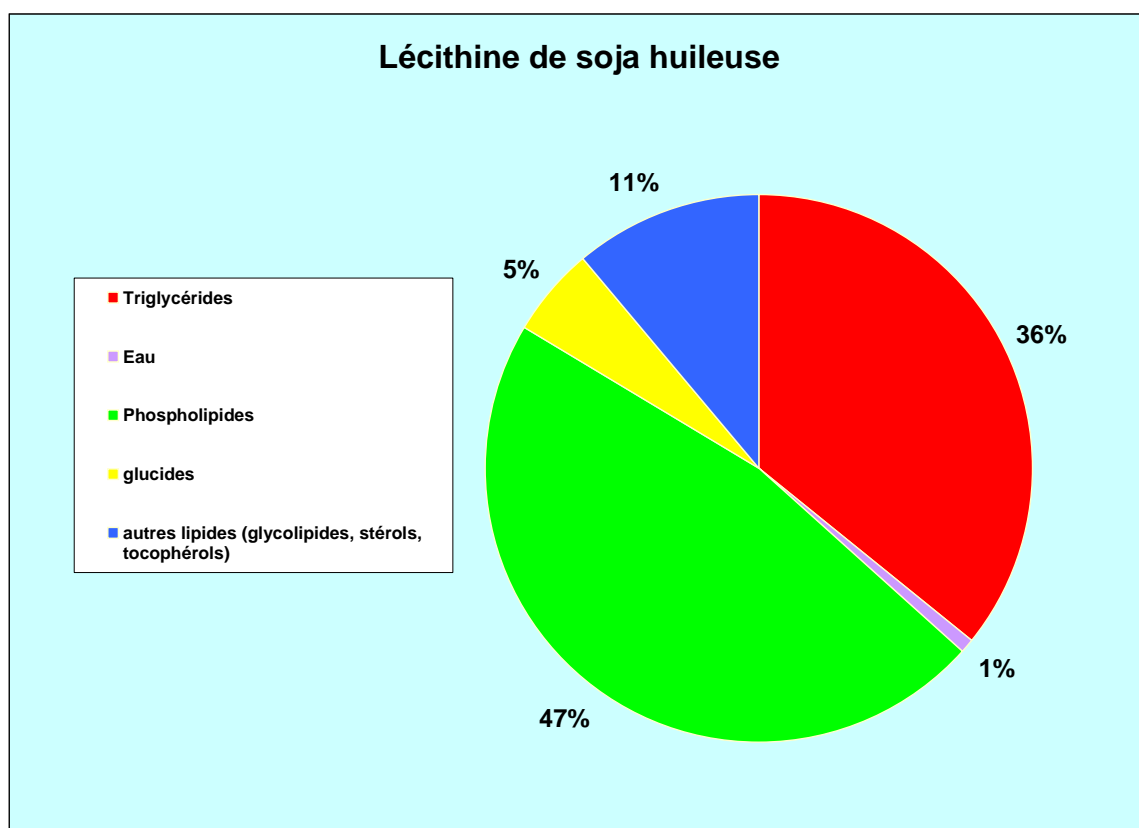


Figure 35 : Composition classique d'une lécithine de soja standard

Le mécanisme de leur action antioxydante est encore mal connu. On suspecte une combinaison de différents effets. Les lécithines joueraient le rôle d'agent chélateur de métaux. Certains des phospholipides auraient également un rôle synergiste et régénateur d'antioxydants antiradicalaires. Enfin, les phospholipides pourraient agir en relâchant un proton amenant ainsi une rapide décomposition des hydroperoxydes sans formation de radicaux libres.

II-3-1 Effet antioxydant des lécithines de soja huileuse, enrichies (déshuilees) ou fractionnées

Nous avons choisi d'évaluer l'effet antioxydant de différentes lécithines de soja disponibles sur le marché. Les compositions en phospholipides de ces lécithines huileuses, enrichies ou fractionnées sont données dans le tableau 9. Les lécithines fractionnées sont issues d'un traitement à l'alcool des lécithines huileuses. Les différents phospholipides présents dans les lécithines huileuses ne présentent pas la même solubilité face à cette extraction alcoolique. Ainsi, la fraction soluble se trouve enrichie en phosphatidylcholine tandis que la fraction insoluble contient principalement les phosphatidyléthanolamines, phosphatidylinositols et acides phosphatidiques. Enfin, les lécithines déshuilees, quant à elles, sont obtenues à partir d'une extraction à l'acétone qui permet de séparer l'huile résiduelle de la partie insoluble à l'acétone dans laquelle se trouvent les phospholipides.

Dans un premier temps, la dose testée pour chacune de ces lécithines a été de 1% en poids par rapport à la matière grasse. Les essais ont été réalisés sur huile de colza seule dont la résistance à l'oxydation après ajout des lécithines a été évaluée par la méthode Rancimat. En parallèle, chaque échantillon a été soumis à un vieillissement accéléré en étuve à 40°C et l'évolution de l'oxydation contrôlée par suivi des indices de peroxydes (Tableau 10).

PL (%)	Vamothin S	Sterncithin F10	Topcithin 50	Nathin 5KE	Nathin 3KE	Nathin 140	Sternpur E
PC	28.8	28.0	28.0	16.9	12.5	74.6	32.9
PE	30.1	29.4	30.7	44.6	32.8	17.4	32.8
PI	26.0	25.6	26.6	16.8	28.1	3.1	20.0
PA	13.7	14.1	13.3	13.9	21.9	3.2	7.1
autres	1.3	2.5	1.3	7.7	4.7	1.6	7.1

Tableau 9 : Composition de la fraction phospholipidique (% molaire) des lécithines testées (PC= phosphatidylcholine, PE= phosphatidyl ethanolamine, PI=phosphatidylinositol, PA= acide phosphatidique, PL=phospholipides)

	Rancimat (Heures)	Indices de peroxydes (meq O ₂ /kg) Jours					
		T= O	T=4 js	T= 8 j	T=14 j	T=25 j	T=35 j
Colza seule	8.4	0.9	1.0	0.9	1.5	8.6	18.4
+ Vamothin S	13.5	0.9	1.1	1.3	1.5	2.6	3.8
+ Sterncithin F10	12.8	0.9	1.1	1.4	1.4	2.4	3.6
+ Topcithin 50	13.1	0.9	1.2	1.2	1.3	2.1	3.2
+ Nathin 5KE	13.1	1.1	1.3	1.6	4.0	4.3	10.0
+ Nathin 3KE	12.4	1.0	1.3	1.4	5.1	9.0	14.0
+ Nathin 140	14.1	1.1	1.4	1.3	1.8	1.9	3.1
+ Sternpur E	12.2	1.0	1.2	1.2	2.2	2.9	4.4

Tableau 10 : Temps d'induction Rancimat (110°C) et valeurs des indices de peroxydes (meq O₂/kg) durant le stockage à 40°C d'une huile de colza raffinée enrichie en lécithines (1% (p/p)).

L'efficacité antioxydante de ces lécithines a été comparée. Premièrement, nous avons pu constater que l'ajout de lécithines permettait de protéger efficacement l'huile de colza contre l'oxydation comme le montre l'évolution des indices de peroxydes au cours du temps (Tableau 10). Par ailleurs, les lécithines huileuses de trois fournisseurs différents (Lucas-Meyer, Vamo-Fuji, Stern) présentaient des activités antioxydantes très comparables. De plus, d'une manière plus globale, et dans l'hypothèse d'une utilisation industrielle, il est apparu que l'usage de lécithines fractionnées ou déshuilées ne se justifie pas puisque leur efficacité est au mieux identique à celle de la lécithine de soja huileuse alors que leur coût est bien plus important. Enfin, d'un point de vue plus fondamental, ces résultats tendent à montrer que le taux de phosphatidycholine est en relation directe avec l'efficacité antioxydante. En effet, il semblerait que plus ce taux est important (Nathin 140, Sternpur E) meilleur est l'effet antioxydant. Au contraire les échantillons présentant les taux de PC les plus faibles (Nathin 3KE et 5KE) ont donné les moins bons résultats.

Par ailleurs, afin d'optimiser l'utilisation de la lécithine de soja huileuse son efficacité antioxydante a été évaluée en fonction de la quantité ajoutée à l'huile de colza. Pour des doses de lécithines de 1 à 5%, nous avons observé que plus la dose de lécithine incorporée est

importante, meilleure est la protection de l'huile de colza. Le taux de 1% par rapport à la matière grasse donne néanmoins une protection tout à fait satisfaisante pour les applications envisagées. Par conséquent, pour la suite de l'étude nous avons décidé de cibler nos essais sur cette dose jugée optimale sur le rapport efficacité/coût de mise en œuvre.

II-3-2 Effet antioxydant de la lécithine de soja huileuse sur différentes huiles et corps gras

Nous avons testé sur les matières grasses suivantes l'effet sur la stabilité oxydative d'un ajout de 1% de lécithine de soja huileuse (Vamothin S) :

- | | |
|--|--------------------|
| - Huile de tournesol classique | - Huile de colza |
| - Huile de soja | - Huile de palme |
| - Huile de noix | - Huile de poisson |
| - Huile de tournesol oléique | |
| - Saindoux supplémenté en tocophérols (150 ppm de teneur garantie) | |

(pour chacune de ces huiles une composition détaillée et leurs teneurs et nature des tocophérols peut être consultée dans l'article en annexe référencé n°26)

Pour toutes les huiles et matières grasses testées, l'ajout de 1% de lécithine huileuse permet d'en améliorer la stabilité (Tableau 11). Cependant, cette amélioration est beaucoup moins significative concernant l'huile de tournesol où, l'accroissement de la stabilité n'est que de l'ordre de 20%.

	Rancimat (Heures)	Indice de peroxydes (meq O2/kg)				PAO (35 j)
		Jours				
		T= 0 j	T= 9 j	T= 29 j	T=35 j	
Colza	8.0	0.9	1.9	12.2	15.1	
Colza + lécithine	14.0	0.9	1.2	2.5	3.3	83
Soja	7.0	1.2	1.8	8.0	13.0	
Soya + lécithine	12.0	1.8	2.4	3.3	5.5	69
Tournesol	5.0	1.2	4.0	19.0	23.2	
Tournesol + lécithine	6.0	1.2	2.4	18.0	22.4	5
Noisette	4.0	6.1	7.0	13.1	18.6	
Noisette + lécithine	7.1	5.8	6.3	7.1	7.8	84
Saindoux	13.0	0.4	1.3	6.4	7.6	
Saindoux + lécithine	32.0	0.6	0.7	1.1	1.2	92
Huile de poisson	1.0	2.8	17.8	21.0	24.0	
Huile de poisson + lécithine	2.5	2.9	5.9	8.7	9.4	70
Palm oil	24.0	0.7	0.9	1.8	3.3	
Palm oil+ lécithine	43.0	0.7	1.0	1.1	1.5	69

PAO= Pouvoir Antioxydant

Tableau 11 : Temps d'induction Rancimat (110°C) et valeurs des indices de peroxydes (meq O₂/kg) durant le stockage à 40°C de différents huiles raffinées enrichies en lécithines (1% (p/p)).

Nous avons envisagé que cette différence de comportement soit due à la nature des tocophérols de l'huile de tournesol. En effet, cette dernière contient en très grande majorité uniquement des alpha tocophérols. On pourrait alors expliquer ces résultats par le fait que la lécithine n'aurait pas d'effet synergique avec les alpha tocophérols alors que ce serait le cas avec les gamma et delta tocophérols que l'on trouve dans les autres matières grasses testées. Afin de valider notre hypothèse, l'influence du type de tocophérols a été évaluée en utilisant du saindoux lequel naturellement ne contient pas de tocophérols. Nous avons alors artificiellement ajouté à cette matière grasse 1% de lécithine huileuse de soja ainsi que différents tocophérols de synthèse. Les résultats ont montré clairement que la lécithine ne présentait aucun effet avec les alpha tocophérols alors qu'un fort effet synergique a été observé pour les gamma et delta.

II-4 Conclusion

Lutter contre l'oxydation dans le cas de la mise en œuvre de matières grasses insaturées pour la formulation de produits céréaliers de cuisson est un problème difficile qui bien souvent nécessite l'utilisation d'additifs antioxydants. Les travaux que j'ai réalisés sur

différents antioxydants naturels de type polyphénols ou sur les lécithines en particulier ont démontré que ces dernières, sous leur forme standard huileuse permettaient une protection efficace des huiles au dosage de 1% en poids par rapport à la matière grasse. Le principe de cette action antioxydante est sans doute basé sur la combinaison de plusieurs effets. Outre les effets chélateurs de métaux bien connus de la littérature scientifique, nous avons mis en évidence que les lécithines développaient vraisemblablement un effet synergiste avec les gamma et delta tocophérols alors que cet effet n'existerait pas pour les formes alpha. Cette absence d'effet synergiste dans ce cas, expliquerait alors la mauvaise protection de l'huile de tournesol par la lécithine de soja. Cet effet synergique serait dû à la fonction hydroxy-aminée des phospholipides du groupe des phosphatidyl-amino-alcools (PC et PE) qui est réductrice, donc donneur d'hydrogène pour régénérer les tocophérols sous forme active. A ce sujet, les résultats sur lécithines fractionnées semblent en effet montrer que les fractions riches en PC présentent la meilleure activité antioxydante.

III - Ré-évaluation du procédé de déshydratation de l'huile de ricin pour la production d'acides linoléiques conjugués (CLA) (Travaux réalisés au CIRAD en collaboration avec Labex Brésil - Pr. R. Lago, 2002-2003)

La culture du ricin est en déclin depuis de nombreuses années au Brésil (Figure 36). Par conséquent, dans le cadre d'un vaste programme de relance de cette culture dans ce pays nous avons établi avec nos collègues brésiliens de l'EMBRAPA, divers travaux de recherche dans le but de trouver de nouvelles applications tant au tourteau de ricin qu'à l'huile extraite. Concernant cette dernière, sera donc présente ici notre étude visant à réévaluer le procédé de déshydratation de cette huile dans le but de produire des acides gras linoléiques conjugués.



BRAZIL - CASTOR CROP in 1000 mtons

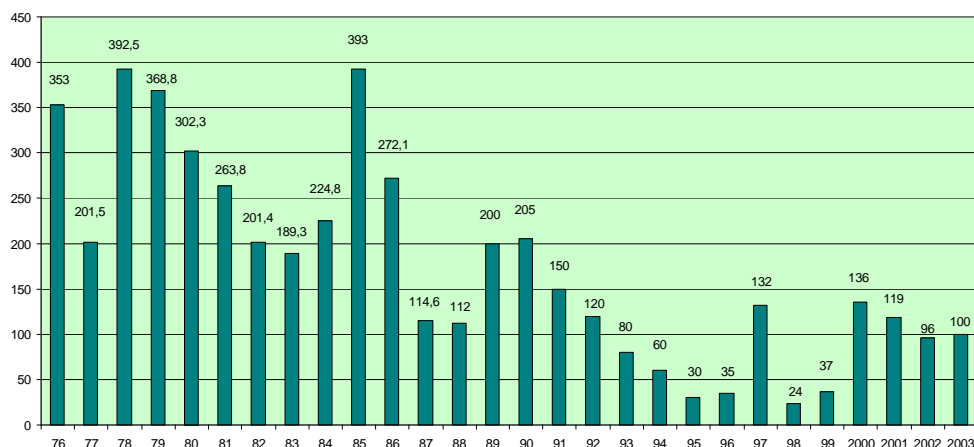


Figure 36 : Évolution de la production annuelle de ricin au Brésil
(figure reproduite avec l'aimable autorisation de la société Bom Brasil)

III-1 les acides linoléiques conjugués ou CLA

On dénomme sous le terme CLA un groupe d'acides gras, isomères géométriques et de position contenant chacun 18 atomes de carbone et deux doubles liaisons conjuguées. Ces doubles liaisons sont donc tout à fait particulières, puisque contrairement aux principaux acides gras rencontrés à l'état naturel, elles ne sont pas interrompues par un groupement CH_2 . Plusieurs isomères existent au sein de la famille des CLA. Ils diffèrent les uns des autres d'une part par la position de leurs doubles liaisons respectives sur la chaîne aliphatique et d'autre part par la nature de ces doubles liaisons qui peuvent être alors de configuration *cis* ou *trans*. A titre d'exemple, la figure 37 montre l'isomère 9-*cis* 11-*trans* de la famille des CLA.

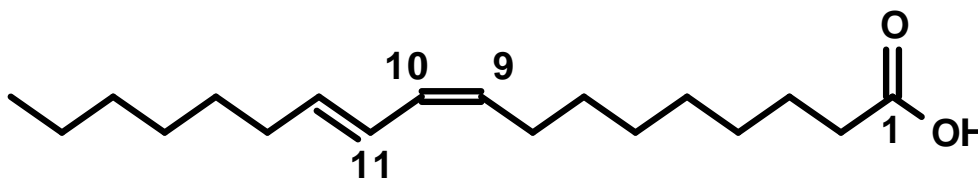


Figure 37 : Structure chimique de l'isomère 9-*cis* 11-*trans*

Ces acides gras ont été identifiés il y a plus de cinquante ans notamment dans le lait dans lequel on peut les retrouver avec des quantités de l'ordre de 6 à 16 mg/g de matières grasses suivant l'origine du lait. Ils sont présents également dans les produits laitiers tels que le beurre où ils peuvent représenter de 12.3 à 14.2 mg/g de matière grasse totale, dans les

fromages de 1.5 à 19.9 mg/g, et enfin dans d'autres produits alimentaires comme certaines viandes (bœuf et agneau) dans des proportions moindres (4.0 à 5.0 mg/g) (O'Shea *et al.*, 2000).

Récemment, des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques fort intéressantes semblent avoir été mises en évidence pour ce type d'acides gras. A titre d'exemple, plusieurs études ont revendiqué une action des CLA sur certains types de cancers, sur l'obésité et sur le diabète. Ainsi, la tendance actuelle est à l'incorporation de CLA dans des aliments fonctionnels pour des applications en nutrition humaine ou en alimentation animale.

III-1-1 Effets physiologiques des isomères du CLA

Beaucoup d'études récentes semblent avoir démontré des effets bénéfiques sur la santé humaine ou animale des isomères de CLA. En particulier, la plupart de ces études tendent à montrer que l'isomère 9-*cis* 11-*trans* est celui qui présente le plus d'activité contre les cellules cancéreuses (Yurawecz *et al.*, 1999).

On peut penser donc que les produits alimentaires enrichis en CLA puissent avoir un rôle préventif ou limitatif pour le développement de cellules cancéreuses chez l'humain. Cependant, l'effet de tels produits reste difficile à démontrer car de longues études cliniques sont alors nécessaires.

En revanche, dans des perspectives d'applications agroalimentaires, d'autres propriétés des CLA sont avantageuses. En effet, certaines études effectuées sur l'animal montreraient que les CLA peuvent contribuer à la réduction de la masse grasseuse. Dans ce cas, ces effets ne sont plus attribués principalement à l'isomère 9-*cis* 11-*trans* mais plutôt au 10-*trans* 12-*cis*.

Les CLA auraient également un rôle dans la préservation des fonctions immunitaires. De plus, on suspecte que ces acides gras permettent d'augmenter les périodes de rémission chez des sujets atteints d'asthme, arthrite ou maladies inflammatoires.

III-1-2 Synthèses biologiques des CLA

Il est envisageable que l'homme ait une capacité à produire du CLA endogène à partir d'acide vaccénique (18:1, 11-*trans*) mais cette capacité est très limitée (Salminen *et al.*, 1998). Par conséquent, la très grande majorité des CLA présents dans les tissus humains sont donc d'origine alimentaire.

Au contraire, chez les ruminants, leur organisme contient une série d'enzymes qui permettent la biosynthèse de CLA, certes en quantité restreinte mais néanmoins significatives. Les CLA sont donc produits naturellement par ces mammifères par une réaction de biohydrogénation des acides gras insaturés dans le rumen. Sous l'action d'une bactérie présente dans le rumen, *Butyrivibrio fibrisolvens*, l'acide linoléique alimentaire est transformé en CLA, eux-mêmes intermédiaires précurseurs de la formation d'acide vaccénique, puis d'acide stéarique. Les CLA sont également formés dans certains tissus comme les glandes mammaires par exemple par l'action d'une delta 9 stearoyl coenzyme A désaturase sur l'acide vaccénique.

Ces acides gras, une fois synthétisés par le ruminant, se retrouvent alors dans son lait et sa viande. En majorité c'est l'isomère 9-*cis* 11-*trans* que l'on retrouve, isomère d'ailleurs communément appelé acide ruménique. D'autres isomères sont présents mais à des teneurs plus faibles.

La teneur et les répartitions en isomères des CLA dans les lipides du lait varient selon la race, l'état de lactation et l'alimentation du bétail même chez des animaux de caractéristiques identiques. Elles peuvent varier notamment du fait de la différence de populations microbiennes dans le rumen ou du taux d'activité des delta 9 désaturases.

III-1-3 Aliments fonctionnels enrichis en CLA

Les meilleures teneurs en CLA que l'on retrouve dans les aliments sont par voie de conséquence celles du lait et des produits laitiers. Cependant, si l'on extrapole les données obtenues sur animal, on considère que les teneurs en CLA qui pourraient avoir un effet sur la santé humaine sont estimées être comprises entre 1.5 à 3.5 g/jour (Banni et Martin, 1998). Ainsi les teneurs observées dans les aliments sont donc bien inférieures à cet apport journalier nécessaire.

Par conséquent, dans le cadre de la conception d'un aliment fonctionnel, il va donc être nécessaire d'augmenter artificiellement la teneur en CLA dans cet aliment naturel ce qui peut être conçu par modification du régime alimentaire de la vache pour lui permettre ainsi d'augmenter les teneurs en CLA de son lait.

Notons également qu'une autre approche peut être envisagée, qui consisterait alors à nourrir les ovins par un régime alimentaire enrichi en CLA, lequel par son action réductrice de la masse grasseuse permettrait alors l'obtention de viande maigre.

A l'heure actuelle, il existe peu de produits sur le marché revendiquant une teneur enrichie en CLA. Par exemple, en Amérique du Nord, citons le fromage « Omega Smart » produit par PurNutra Inc (Canada). Ce produit commercialisé en juin 2001 affiche une teneur en CLA d'environ 44 mg/portion. Cependant, comme son nom l'indique, c'est la teneur en acide oméga 3 qui est revendiquée et nullement celle en CLA.

III-1-4 CLA et alimentation animale

Effet sur le lait et les produits laitiers : La majorité des travaux effectués pour augmenter les teneurs en CLA des laits de vaches est concentrée sur des modifications des régimes alimentaires des ruminants. Des études ont évalué l'effet de régimes alimentaires enrichis en huiles végétales sur des vaches et la teneur en CLA des laits produits (Donovan *et al*, 2000 ; Chilliard *et al*, 2001). Ainsi, un régime enrichi en huile de soja (dont l'acide gras majoritaire est l'acide linoléique) conduisait à une augmentation du taux de CLA alors que l'huile de lin, riche en acide linoléique ne permettait pas une telle augmentation. Des études ont également été effectuées sur la chèvre et son lait. Dans ce cas, Mir *et al* , (1999) ont étudié l'effet d'un régime alimentaire enrichi en huile de colza chez ces animaux. Lorsque le pourcentage d'huile de colza croît de 0 à 4% de la diète une augmentation conjointe du taux de CLA de 1.05 à 3.20% de la matière grasse totale est observée. Il est intéressant de noter que cette augmentation est très supérieure à celle qui a été obtenue avec des vaches et ceci probablement du fait que le lait de chèvre est plus riche en acides linoléique et linoléique.

Effet sur les tissus adipeux : taux de CLA et réduction de la masse grasseuse : Concernant les tissus adipeux, il est généralement admis que la supplémentation en CLA dans les régimes alimentaires de ruminants n'est pas très efficace pour augmenter le taux de CLA dans ces tissus. En effet, on constate que le supplément alimentaire est rapidement hydrogéné dans le rumen. Des auteurs ont alors pensé qu'il était possible d'éviter ce phénomène en soumettant le régime enrichi en CLA non pas à des animaux adultes mais plutôt aux jeunes pré-ruminants pour lesquels la supplémentation sous forme fluide est directement absorbée sans passer par le rumen. Ainsi, par exemple, Mir *et al*. (2000) ont étudié l'effet d'une supplémentation de l'ordre 0.33 g de CLA durant 21 jours sur des jeunes agneaux de 4 semaines. Les résultats ont

montré une réduction du gras adipeux chez les animaux nourris avec du CLA en comparaison avec ceux qui ne l'étaient pas.

III - 2 Synthèse de CLA

Étant donné le grand intérêt que suscitent les CLA, les méthodes de synthèses chimiques ou enzymatiques permettant l'obtention de concentrats de CLA (sous forme d'acides gras libres) ou d'huiles enrichies en CLA sont actuellement très étudiées. Le but de ces travaux est bien sûr de proposer un procédé commercial, à la fois économiquement rentable et qui permet d'obtenir avec un rendement satisfaisant les acides gras CLA. De plus, idéalement, le procédé doit permettre d'aboutir en une composition bien déterminée au niveau du mélange des différents isomères.

II-2-1 Production à partir d'huiles végétales

Ces méthodes de production apparaissent sans aucun doute comme les plus économiquement rentables. Si l'on excepte les techniques d'hydrogénations partielles des huiles qui conduisent à la formation de CLA par des réactions d'isomérisation mais également à la production d'acides gras *trans* non conjugués, redoutables d'un point de vue nutritionnel et métabolique, il existe deux procédés permettant d'obtenir les CLA à partir d'huiles végétales. Ces deux méthodes sont l'isomérisation alcaline d'huiles riches en acides linoléiques et la déshydratation de l'huile de ricin.

Déshydratation de l'huile de ricin :

Cette huile et ce procédé seront décrits plus en détails ultérieurement. L'huile de ricin contient de 85 à 90% d'acide ricinoléique (12-hydroxy-9-*cis*-18:1) lequel peut être déshydraté sous l'influence de la température et en présence d'un catalyseur acide. Cette déshydratation conduit à l'apparition d'une double liaison supplémentaire sur la chaîne aliphatique de l'acide gras ricinoléique transformé. Cette double liaison peut alors être conjuguée par rapport à la double liaison initialement présente. Dans ce cas, on obtient alors un CLA. La formation de différents isomères est alors possible mais de manière générale c'est le 9-*cis* 11-*trans* qui est formé préférentiellement. Parallèlement, la double liaison qui se forme peut ne pas être dans une position conjuguée par rapport à la double liaison initiale, dans ce cas on obtient alors l'acide linoléique 18:2 classique.

La réaction de déshydratation de l'acide ricinoléique peut être effectuée directement sur l'huile de ricin auquel cas des triacylglycérols enrichis en CLA sont obtenus ou sur l'ester méthylique ou éthylique de l'acide ricinoléique, on obtient alors des concentrats d'esters de CLA.

Il apparaît plus judicieux de travailler directement sur l'huile de ricin non seulement de manière à simplifier le procédé mais également afin de permettre la production *in situ* de CLA. En effet, on obtient alors des triglycérides enrichis en CLA, le produit final correspondant ainsi en tout point à la structure chimique d'une huile naturelle ce qui revêt une importance primordiale d'un point de vue métabolique notamment au niveau de l'absorption de ces CLA par l'organisme.

Ce procédé de déshydratation de l'huile de ricin est connu depuis longtemps car il permet d'obtenir des dérivés agents séchants dans l'industrie des peintures et des vernis. Bien entendu, les études menées il y a plus de cinquante ans, ne stipulaient pas quels isomères particuliers de CLA étaient obtenus. Ce n'est que récemment que les progrès en matière de techniques chromatographiques permettent une bonne fiabilité quant aux analyses destinées à identifier et quantifier les différents isomères de CLA formés.

A titre d'exemples de réaction de déshydratation de l'huile de ricin, citons les travaux de Waheeduddin *et al.* (1966) qui permettent une production en 4H de 31.7% de CLA total avec 1,5% sodium bisulfate – 0,5% sodium bisulfite à 230°C ou encore ceux de Radlove *et al.* (1948) puis de Terril (1950).

Isomérisation alcaline de l'acide linoléique

La deuxième méthode de production de CLA à partir d'huile végétale consiste à travailler à partir des esters méthyliques d'une huile riche en acide linoléique telle que le tournesol ou le soja. Ainsi, ces esters méthyliques qui contiennent en grande majorité l'acide linoléique sont isomérisés par catalyse basique forte pour former des CLA. Une fois la réaction d'isomérisation alcaline effectuée, le mélange de CLA est obtenu sous forme de savons lesquels doivent alors être transformés en acides gras libres après addition d'acide dilué (Saebo, 2001). Bien entendu, la teneur en CLA du produit final est directement corrélée à la teneur initiale en acide linoléique. Les CLA obtenus par isomérisation alcaline correspondent

toujours à un mélange complexe d'isomères. Cependant, une optimisation des paramètres réactionnels permet en général de mieux cibler ce mélange.

L'utilisation d'hydroxyde de sodium comme catalyseur en utilisant l'éthylène glycol comme solvant a conduit à un mélange de 4 isomères : 8-*trans* 10-*cis*, 9-*cis* 11-*trans*, 10-*trans* 12-*cis* et 11-*cis* 13-*trans*. L'hydroxyde de potassium, utilisé dans des conditions de température plus douces, donne des quantités à peu près équivalentes de 9-*cis* 11-*trans* et 10-*trans* 12-*cis* et ces deux isomères constituent près de 90% du total des CLA formés (Saebo, 2001). Des températures plus élevées ainsi que des temps de réaction plus longs favorisent la formation des isomères *trans trans* indésirables.

D'autres méthodes plus récentes font appel à des catalyseurs métal de transition de type rhodium et ruthénium. Des tests d'isomérisation alcaline d'esters méthyliques d'huile de soja effectués à 60°C ont permis grâce à ces catalyseurs d'obtenir des rendements de conjugaison de l'ordre de 90% (Larock *et al.*, 2001).

Après acidification, la fraction lipidique est en général extraite à l'hexane puis le solvant est évaporé. On obtient finalement un produit contenant environ 60 à 75% de CLA en poids. Une étape de désodorisation peut être ensuite effectuée de manière à éliminer toute trace de solvant résiduel de même que d'éventuels composés secondaires d'oxydation.

En conclusion, la réaction d'isomérisation alcaline de l'acide linoléique conduit à des concentrats de CLA sous forme d'acides gras libres ou d'esters alkyliques. C'est d'ailleurs sous cette forme que l'on trouve la majorité des produits commerciaux riches en CLA. Ce point constitue le gros désavantage de la méthode, car comme cela était mentionné plus haut, il est largement préférable d'obtenir les CLA sous forme de triacylglycérols comme cela est le cas lorsque la réaction pratiquée est la déshydratation de l'huile de ricin.

Techniques d'enrichissement enzymatique

De nombreuses publications existent dans lesquelles des lipases microbiennes sont employées pour enrichir des huiles en CLA. Les conditions réactionnelles sont douces (50 à 60°C) et les phénomènes d'isomérisation naturelle des CLA sont donc très limités. Plusieurs exemples ont été récemment publiés dans lesquels des lipases issues de *Candida antarctica* ou *Mucor miehei* permettent d'incorporer dans les triacylglycérols des huiles des CLA

initialement sous forme de concentrats de type acides gras libres ou esters. Ces techniques sont employées notamment par le groupe Loders Crocklaan pour la production Clarinol™ (huile enrichie en CLA) (Mc Neill *et al.*, 1999).

De même, les spécificités des lipases peuvent être mises à profit pour enrichir en un isomère donné des huiles déjà riches en CLA. L'enzyme la plus utilisée est alors la lipase de *Geotrichum candidum* laquelle est très sélective des acides gras possédant une 9-*cis* double liaison sur leur chaîne aliphatique. Ainsi, Haas *et al.* (1999) ont utilisé ce biocatalyseur pour hydrolyser spécifiquement le CLA 9-*cis* 11-*trans* à partir d'un mélange d'esters méthyliques de CLA, cette hydrolyse spécifique permettant de récupérer l'isomère désiré dans la fraction acides gras libres où il représentait de 77 à 94%.

II-2-2 Synthèses microbiologiques

Les techniques microbiologiques peuvent être également employées car certaines bactéries sont en mesure de produire des CLA. Ainsi des cultures de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. ont pu tolérer 1000 microgr/ml d'acide linoléique pour un rendement de transformation en CLA allant de 57 à 87%, les CLA produits consistant en un mélange à 85-90% des isomères 9-*cis* 11-*trans* et 9-*trans* 11-*cis* (Rainio *et al.*, 2001). De même, Ogawa *et al.* (2001) proposent l'utilisation de *Lactobacillus acidophilus* pour produire les isomères 9-*cis* 11-*trans* et 9-*trans* 11-*cis* ainsi que le 9-*trans* 11-*trans*. Un maximum de 80% des acides gras totaux formés est reconnu pour être des CLA, principalement sous forme d'acides gras libres.

En l'état actuel des choses, les synthèses microbiologiques de CLA apparaissent séduisantes, mais leur faisabilité au delà de l'échelle du laboratoire et leur rentabilité économique restent encore à démontrer.

III-3 L'huile de ricin

Comme cela a été décrit ci-dessus, l'huile de ricin peut être considérée comme une matière première de choix pour la synthèse des acides gras CLA. Cette huile est issue de la plante *Ricinus communis* L. qui pousse dans la plupart des zones tropicales et subtropicales. L'origine du ricin n'est pas connue à ce jour. On pense que la plante s'est d'abord développée en Afrique de l'Est pour ensuite atteindre le Moyen Orient. L'huile de ricin était connue en Inde et en Chine il y a plus de 3000 ans. Puis, elle a gagné l'Amérique du Sud à l'époque de la colonisation. A l'heure actuelle, l'Inde, la Chine et le Brésil produisent à eux seuls 90% de

la production mondiale ce qui représente environ 1 million de tonnes par an. Notons également qu'il existe en Europe de petites productions locales principalement à partir de variétés naines à croissance régulière et hauts rendements. Les graines de ricin ont des proportions très variables, elles peuvent parfois mesurer plus du double de la taille des graines de café. Leur longueur varie de 8 à 23 millimètres, leur largeur de 5 à 14, et leur poids de 0.8 à 1.3 gramme. La teneur en matières grasses des graines décortiquées peut varier de 35 à 60%. Les graines sont très toxiques par la présence d'une phytoxine antigène, la ricine, qui s'associe aux globules rouges. A la dose de 0.0035 mg/kg soit l'équivalent de 5 graines ingérées par un individu de corpulence normale, la ricine est considérée comme létale pour l'homme. En revanche, fort heureusement, elle est détruite par la chaleur et lors du procédé d'extraction de l'huile par solvant. De plus, la graine contient également un alcaloïde, la ricinine ainsi qu'une protéine allergène, la CB1A, qui peut provoquer des irritations sévères du système respiratoire. Il faut noter cependant que ces substances sont absolument insolubles dans l'huile. Enfin, notons qu'à l'heure actuelle, il existe un programme de recherche initié aux USA tentant de produire par modification génétique une plante de ricin qui ne contiendrait pas de ricine. Il est estimé que d'ici 5 à 7 ans, cette nouvelle plante pourrait être mise sur le marché.

Dans les pays producteurs, la récolte des graines se fait de manière rudimentaire à la main. L'huile de ricin est obtenue par pressage de la graine de ricin, suivi par une filtration. Après raffinage, on obtient une huile de couleur jaune pâle. L'huile est très singulière parmi les huiles végétales car elle est constituée principalement d'acide ricinoléique, un acide gras particulier qui contient un groupement hydroxyle (C18: 1, n-9 *cis*, n-7 OH). L'acide ricinoléique peut représenter de 85 à 90% de la composition totale en acide gras de l'huile. Par ailleurs, on trouve également les acides oléique, linoléique et stéarique .

Cette composition particulière lui confère donc des propriétés physicochimiques uniques. Ainsi, il s'agit là de l'huile avec le plus haut indice de viscosité et qui contrairement aux autres huiles est totalement soluble dans les alcools alors que sa miscibilité dans les solvants aliphatiques est limitée.

L'huile de ricin est destinée à deux types d'utilisations, l'une en pharmacie pour ses propriétés laxatives bien qu'elle soit de plus en plus remplacée par des médicaments récents, l'autre dans le secteur industriel. Pour ce dernier, l'huile de première pression est utilisée pour la production de résines employées en tant qu'agent liant dans les vernis.

Concernant l'huile modifiée chimiquement, le procédé de déshydratation donne une huile pale et inodore utilisée pour la production de résines acryliques. L'huile de ricin hydrogénée, quant à elle, obtenue sous la forme de pellets, est utilisée en tant que graisse lubrifiante ou précurseur de la synthèse de cires. De plus, l'huile de ricin hydrogénée ajoutée à des graisses en augmente significativement la résistance thermique. Elle est également utilisée en peinture pour empêcher le jaunissement des produits et en faciliter l'étalage.

En France, l'huile de ricin est très utilisée pour la synthèse de polyamides qui sont obtenus par décomposition chimique de l'huile en aldéhyde et acide undécylénique à des températures de l'ordre de 500 à 600°C. Enfin, l'acide sébacique est un autre dérivé de l'huile de ricin. Bien que moins utilisé de nos jours, il est employé pour la synthèse de nylon. Le tourteau est quant à lui toxique pour les animaux ; il n'est alors employé que comme engrais.

III-3 Travaux menés au CIRAD sur la déshydratation de l'huile de ricin

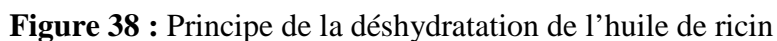
Comme cela a été mentionné ci-dessus, le procédé de déshydratation du ricin est connu depuis très longtemps. De ce fait, la plupart des publications que l'on trouve sur le sujet datent de plus de cinquante ans et par conséquent donnent très peu d'informations quant à la teneur des CLA formés et *a fortiori* on y trouve pratiquement aucune données relatives à la nature des isomères conjugués formés. Ce constat, couplé au fait que la catalyse hétérogène a permis ces dernières années la mise sur le marché de nouveaux catalyseurs très efficaces, nous a emmené à reconsidérer ce « vieux » procédé et à évaluer les potentialités de différents types de catalyseurs pour former préférentiellement au cours de la déshydratation l'isomère 9-*cis* 11-*trans*, puisque celui-ci est supposé être primordial dans les différents effets santé décrits au sujet des CLA.

Sont donc décrits ci-dessus nos résultats les plus récents relatifs à cette étude. Cependant, ces travaux étant toujours en cours, nous préférons ne pas dévoiler la nature exacte des catalyseurs employés. Par la suite ils seront donc dénommés catalyseurs A, B,C,D etc...

III-3-1 Principe et suivi analytique de la réaction

Quand l'huile de ricin est chauffée en présence de catalyseurs de type acide de Lewis ou de Bronsted, les acides ricinoléiques perdent une molécule d'eau par une réaction d'élimination. Le départ du groupement hydroxyle et d'un atome d'hydrogène adjacent engendre alors la formation d'une double liaison dans la chaîne d'acide gras. Cette nouvelle double liaison peut alors se localiser sur une position conjuguée par rapport à la double liaison

Dans le cas où la nouvelle double liaison se place sur une position non conjuguée, on forme alors de l'acide linoléique classique et son isomère *trans* – *cis* (Figure 38). De manière générale, parmi les isomères formés, on observe que le CLA 9-*cis* 11-*trans* est majoritaire, cependant, selon les paramètres réactionnels, tels que température de chauffage, durée de la réaction, nature et quantité du catalyseur employé, un profil différent de formation des isomères peut être obtenu.



Pour optimiser le rendement de la réaction, le réacteur de déshydratation est nécessairement placé sous pression réduite afin de chasser en continu l'eau produite au cours de la réaction. De plus, une atmosphère d'azote est maintenue dans le milieu pour éliminer toute trace d'oxygène pouvant engendrer un phénomène d'oxydation des acides gras poly-insaturés formés (CLA+ acide linoléique). Cependant, des effets de mésomérie entraînent la formation d'autres CLA isomères tels que le 10-*trans* 12-*cis*, le 10-*cis* 12-*cis* et le 9-*trans* 11-

trans. Il est bon de noter également qu'au cours du procédé de déshydratation une réaction secondaire peut avoir lieu. Il s'agit d'une réaction de polymérisation entre différents acides ricinoléiques qui aboutit alors à la formation de composés du type estolides. Pour éviter la formation de ces polymères, de la poudre de zinc est ajoutée de manière à ce qu'elle joue le rôle d'agent antipolymérisant.

Le suivi de la réaction est effectué par CPG après transformation en esters méthyliques des acides gras constitutifs de l'huile de ricin déshydratée. L'identification des isomères de CLA formés au cours du temps est réalisée par comparaison avec les temps de rétention d'une solution standard de CLA contenant différents isomères. Ainsi, à différents temps de réaction, il est possible de déterminer le taux de conjugaison obtenu (pourcentage total de CLA formé), ainsi que la répartition des différents isomères. Un exemple de chromatogramme est donné en Figure 39.

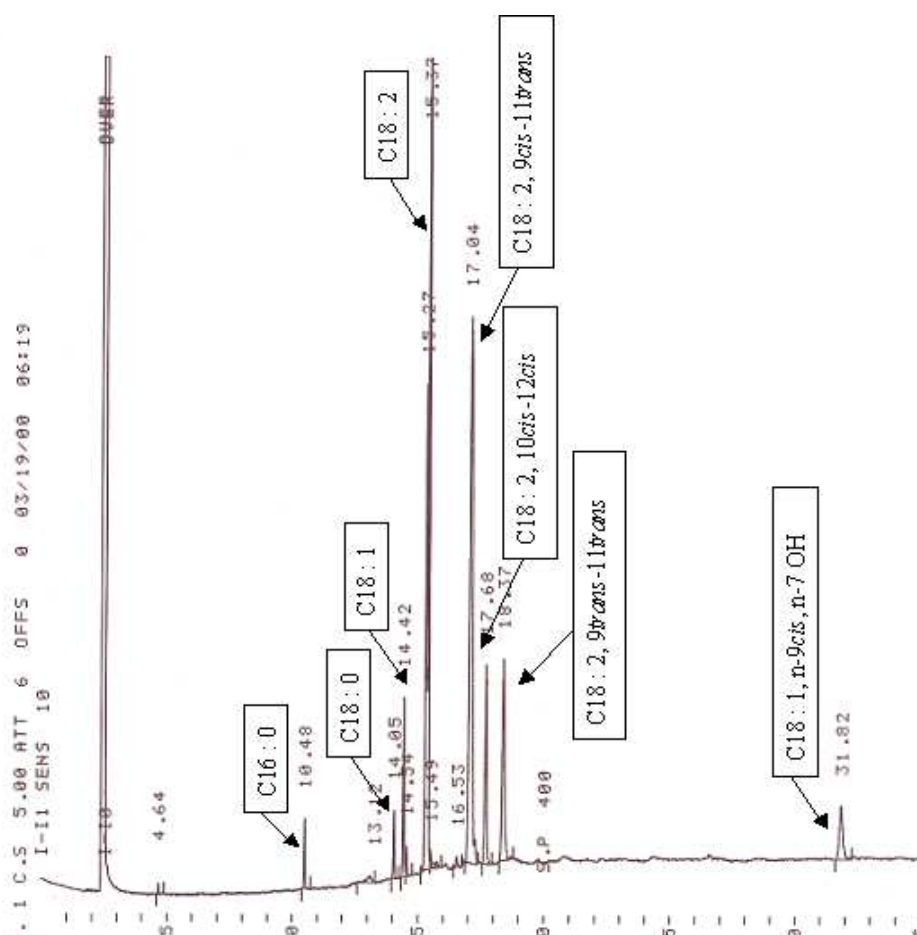


Figure 39 : Exemple de chromatogramme pour le suivi analytique de la formation des différents isomères de CLA lors de la déshydratation de l'huile de ricin catalysée par un catalyseur de type acide de Lewis ou de Bronsted

III-3-2 Résultats

Les nombreux essais que nous avons menés avec différents types de catalyseurs nous ont permis de dégager un certain nombre de tendances. Certains catalyseurs n'ont pas du tout été efficaces et aucune formation de CLA n'a été observée probablement en raison d'une température réactionnelle trop basse ou en raison de fortes réactions parasites de polymérisation. D'autres catalyseurs ont certes permis la formation de CLA mais dans des proportions minimales. Pour ces essais, les résultats obtenus pouvaient être dus soit à une température réactionnelle insuffisamment élevée, soit à une quantité de catalyseur réduite, soit à une activité catalytique insuffisante. Enfin, les essais qui ont été estimés concluants pour le moment sont ceux pour lesquels la quantité de CLA formée était supérieure à 30% après 24 heures de réaction. Parmi eux, concernant la répartition des isomères formés, on peut classer les catalyseurs testés en fonction de la répartition des isomères de CLA formés. Certains ont conduit à des productions majoritaires de 9-*cis* 11-*trans* tandis que d'autres permettent la synthèse privilégiée du CLA 9-*trans* 11-*trans*.

A titre d'exemple, certains des résultats obtenus sont donnés dans le tableau 12.

Catalyseur	% d'acides gras					% de 9- <i>cis</i>		
	9- <i>c</i> 11- <i>tr</i>	10- <i>tr</i> 12- <i>cis</i>	10 <i>cis</i> 12- <i>cis</i>	9- <i>tr</i> 11- <i>tr</i>	% CLA formés	11- <i>trans</i> (sur total CLA)	Ac. Linoléique	Ac Ricinoléique
Cat A	14.70	2.15	6.06	15.10	38.01	38.67	51.32	1.85
Cat B	8.72	2.61	3.52	20.09	34.94	24.96	48.31	1.67
Cat C	30.76	0.00	7.07	9.63	47.46	64.81	39.23	3.64
Cat D	9.09	2.84	4.23	18.09	34.25	26.54	38.13	4.94
Cat E	20.55	0.43	4.55	8.82	34.35	59.83	49.85	5.71
Cat F	13.58	2.51	6.71	12.40	35.20	38.58	55.63	0.51
Cat G	10.82	1.90	3.41	15.43	31.56	34.28	35.69	14.85


Tableau 12 : Résultats d'essais de déshydratation réalisés

III - 4 Conclusion

Les premiers résultats obtenus montrent que la réaction de déshydratation de l'huile de ricin est une méthode efficace pour produire des acides linoléiques conjugués. En effet, suivant le catalyseur employé et la température réactionnelle, il est possible d'obtenir en fin de réaction une huile de ricin déshydratée dont la composition en acides gras présente des teneurs significatives en CLA comprise en moyenne entre 30 et 50 %. De manière générale, deux isomères sont préférentiellement formés, le CLA 9-*cis* 11-*trans* et le 9-*trans* 11-*trans*. Cependant, en modulant les conditions opératoires, telles que nature et quantité du catalyseur employé, durée et température de réaction, on peut orienter la réaction de déshydratation vers l'isomère désiré, c'est à dire le 9-*cis* 11-*trans*. Au terme de la réaction, on obtient alors une huile nouvelle issue de l'huile de ricin initiale mais dont la composition est totalement différente. En effet, alors que l'on partait d'une huile contenant naturellement de l'acide ricinoléique en forte proportion (environ 90%), l'huile finale quant à elle, contient globalement 50% d'acide linoléique (formé parallèlement au cours de la réaction par un procédé de déshydratation non conjuguée) et 40 à 45% de CLA. Enfin, des traces minimales d'acide ricinoléique n'ayant pas réagi ainsi que le restant d'acides gras initialement présents dans l'huile de départ (palmitique, stéarique, oléique en particulier) sont trouvés. Il faut donc noter que la nouvelle huile obtenue présente ainsi des propriétés nutritionnelles tout à fait remarquables puisqu'elle serait potentiellement une source importante d'acides gras essentiels omega 6 (acide linoléique) ainsi que des isomères à doubles liaisons conjuguées dont les activités biologiques sont très recherchées.

Ainsi, si l'on compare ce procédé aux autres méthodes chimiques existantes pour la production de CLA on constate que la déshydratation de l'huile de ricin a plusieurs avantages sur l'isomérisation alcaline d'esters d'huiles riches en acide linoléique. En effet, il a été précédemment expliqué que ce dernier procédé nécessitait de transformer au préalable l'huile de tournesol ou de soja en esters méthyliques voire en acides gras libres pour ensuite isomériser ces derniers et produire enfin les dérivés conjugués. Les CLA sont alors obtenus sous forme de concentrats d'esters ou d'acides. Au contraire, la réaction de déshydratation de l'huile de ricin se fait en une seule étape suivant un procédé relativement simple. L'huile est simplement chauffée en présence d'un catalyseur de type acide de Lewis ou de Bronsted et dans ces conditions sous l'effet de la chaleur, l'acide ricinoléique sous forme d'esters de triacylglycérols perd une molécule d'eau au profit de la formation d'une double liaison supplémentaire sur sa chaîne. Ainsi, le produit final obtenu ressemble en tous points à une

huile classique puisque les CLA produits sont toujours sous forme de triglycérides. D'un point de vue métabolique, nous considérons que ce paramètre confère à la déshydratation du ricin un avantage certain par rapport aux réactions d'isomérisation alcalines de linoléate de méthyle, puisque sous forme de triglycérides, il est très probable que les CLA soient mieux absorbés par l'organisme et donc que leur activité biologique soit plus efficace.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce mémoire décrit mes activités de recherche sur une période d'un peu plus de dix ans. On peut y constater que mon domaine de recherche majeur concerne la mise en œuvre d'enzymes lipolytiques ou lipases dans divers procédés soit de biocatalyse pour la lipophilisation de molécules biologiquement actives, soit dans des opérations du biofaçonnement des corps gras.

Concernant ce dernier point, on observe depuis plusieurs années une augmentation spectaculaire de l'utilisation de biocatalyseurs en phase aqueuse limitée. Les avantages potentiels de la catalyse enzymatique en milieu fondu ou en présence de solvants organiques sont en effet nombreux. Les réactions biocatalysées permettent notamment de travailler dans des conditions douces de températures et de pression et minimisent la formation de produits secondaires. De plus, en raison de leur spécificité d'action très pointue, les lipases favorisent l'obtention de nouveaux corps gras aux propriétés physico-chimiques et nutritionnelles bien déterminées. Citons le cas des nombreux exemples de production par voie enzymatique de triacylglycérols restructurés dont la composition et la distribution en acides gras sont parfaitement définis. A ce jour, la très grande majorité des lipases utilisées est d'origine microbienne voire animale. En effet, les outils de la biologie moléculaire associés aux techniques de conditionnement de ces enzymes permettent de produire des biocatalyseurs aux propriétés d'action tout à fait satisfaisantes pour catalyser des réactions du biofaçonnement des corps gras telles qu'hydrolyse, estérification, transestérification, interestérification ou encore alcoolyse.

Cependant, le désavantage majeur qui limite encore le développement à plus grande échelle de ces procédés enzymatiques, réside dans le fait que ces biocatalyseurs microbiens sont encore d'un coût relativement élevé, et de plus, produits par des technologies qui parfois ne sont pas encore maîtrisées dans toutes les régions du globe ; on pense en particulier à certains pays en voie de développement. Enfin, la production de telles lipases microbiennes fait bien souvent appel à des techniques de modifications génétiques ce qui peut être problématique en fonction des contraintes législatives imposées par le pays dans lequel le procédé est développé.

Pour toutes ces raisons, en collaboration avec mes différents collègues du CIRAD, j'ai choisi d'orienter mes travaux sur l'étude et la mise en oeuvre de lipases végétales. En effet, bien que beaucoup moins étudiées, on peut considérer que ces enzymes présentent de nombreux avantages en raison de leur coût largement inférieur et de leur grande disponibilité. Elles peuvent donc constituer une alternative prometteuse à l'usage des lipases microbiennes. A titre d'exemple, les travaux qui sont décrits dans le chapitre 2 de ce mémoire sur la lipase du latex de *Carica papaya* montrent qu'une meilleure connaissance des activités et sélectivités de ces poudres lipasiques végétales favorise leur utilisation dans le domaine de la bioconversion des lipides et permet la conception de procédés enzymatiques innovants et économiquement concurrentiels par rapport à ceux déjà existants et faisant appel à des enzymes d'origine microbienne.

Par conséquent, pour les prochaines années, j'envisage de poursuivre ces travaux sur la valorisation de la biomasse végétale par la mise en évidence d'activités enzymatiques dans ces matériaux pouvant être mises à profit dans différents procédés biotechnologiques. Il n'est pas exclu que je sois conduit à travailler sur la valorisation d'autres activités enzymatiques (glycosidases, phénoloxydases etc...), néanmoins je souhaite dans un premier temps focaliser mes travaux sur les activités de type lipasiques et phospholipasiques. Dans un contexte de partenariat avec les pays du Sud, il conviendra alors de travailler à la mise au point de procédés enzymatiques du biofaçonnement des corps gras faisant appel à des biocatalyseurs relativement rudimentaires, comme cela a été le cas par exemple avec le latex de papaye lequel était utilisé sous forme de poudre brute séchée dans les opérations que j'ai décrites dans le chapitre 2. De même, les travaux initiés avec nos collègues équatoriens au sujet du latex de babaco ou encore ceux débutant dans le cadre d'une collaboration franco-brésilienne sur la valorisation des sources d'enzymes végétales de ce pays, démontrent clairement que la conception de procédés enzymatiques à partir de matériaux biocatalytiques végétaux n'est pas illusoire. Ainsi, même si cela peut paraître utopique voire trop ambitieux, j'espère que mes futurs travaux de recherche permettront à certains pays partenaires du CIRAD de disposer à leur tour de procédés enzymatiques conduisant à la conception et la mise sur le marché de nouveaux corps gras du type triacylglycérols restructurés dont les propriétés nutritionnelles, physico-chimiques voire thérapeutiques sont particulièrement recherchées.

Bien entendu, un travail considérable reste encore à réaliser notamment pour comprendre de manière plus approfondie le comportement catalytique des lipases dans les procédés du biofaçonnement des corps gras. Par exemple, j'ai tenté de montrer tout au long de ce mémoire que certaines propriétés des enzymes lipolytiques n'étaient encore que partiellement connues en particulier lorsqu'il s'agit de travailler en phase aqueuse limitée. L'exemple de l'influence majeure de paramètres tels que la teneur en eau ou l'activité thermodynamique de l'eau sur les propriétés acyltransférasiques des lipases a été largement commenté tout au long de ce document. Ainsi, dans le but de mieux connaître et comprendre les comportements de lipases dans ces procédés, j'envisage de collaborer de manière plus extensive avec des équipes plus « fondamentalistes » en particulier celle du laboratoire de Lipolyse enzymatique (CNRS, Marseille) dirigée par F. Carrière. De la même façon, l'exemple des travaux réalisés par Caro *et al* sur les isothermes de sorption de la lipase de *Carica papaya* montrent clairement que la mise en commun de compétences complémentaires au sein de l'UMR conduit à la production de résultats scientifiques permettant d'avancer significativement sur ce sujet.

Dans ce contexte plus global de la création de l'UMR « Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes) dirigée par Stéphane Guilbert, les compétences du laboratoire de Lipotechnie seront mises à profit au sein d'un axe de recherche dédié aux Technologies « douces » de stabilisation et de fonctionnalisation. Ainsi, concernant le biofaçonnement des corps gras, cet axe correspond à la mise en œuvre de biocatalyseurs lipasiques (de préférence d'origine végétale) dans des procédés doux de température et de pression et si possible sans ajout de solvant afin de « fonctionnaliser » l'huile ou le corps gras traité de manière à lui conférer les propriétés nutritionnelles, ou physico-chimiques désirées. Par exemple, on peut envisager que les techniques enzymatiques permettent la synthèse de glycérides partiels particuliers présentant des propriétés barrières à l'eau tout à fait intéressantes pour être utilisés dans la formulation d'aliments composites et limiter ainsi les phénomènes de migration d'eau au sein de ces matrices alimentaires. De même, ces techniques enzymatiques pourront permettre de fonctionnaliser à des fins nutritionnelles des corps gras, par exemple par des enrichissements en acides gras spécifiques de manière à répondre parfaitement aux recommandations nutritionnelles (rapport w6/w3, taux saturés/insaturés, acides poly-insaturés longues chaînes, etc...) ou pour formuler des dérivés lipidiques destinés à lutter contre certains problèmes alimentaires (ex : TAG à chaînes moyennes pour alimentation de nouveaux-nés prématurés, TAG partiellement assimilés pour lutter contre le phénomène

d'obésité). Pour mener à bien l'ensemble de ces travaux, même si le réseau NUTRILIPID n'est pas effectivement établi cette année, je pense qu'il serait très avantageux de se rapprocher d'autres équipes européennes intervenant sur des sujets similaires liés à la bioconversion des corps gras. Citons par exemple, l'équipe du Pr. Bornscheuer (Univ. Greifswald, Allemagne), celle du Pr. Parmentier (ENSAIA, Nancy) ou encore celles des Pr Xu (DTU, Copenhague, Danemark) et Haraldsson (Univ. Reykjavik, Islande). De même, on peut également envisager de collaborer avec l'équipe de Nicole Combe (ITERG, Bordeaux) pour mieux évaluer l'impact d'un point de vue métabolique de ces corps gras fonctionnalisés par restructuration enzymatique.

Si l'on excepte mes travaux sur l'oxydation des matières grasses menés ponctuellement au sein du Groupe Danone, l'autre domaine de recherche auquel j'ai consacré beaucoup de mon temps correspond à l'utilisation des lipases en biocatalyse pour la synthèse de molécules polyfonctionnelles. Là encore, ces travaux rejoignent l'axe de recherche de notre UMR puisqu'il s'agit de fonctionnalisations douces par lipophilisation enzymatique de substrats hydrophiles conduisant à l'obtention de nouvelles molécules combinant différentes propriétés (antioxydantes, tensioactives, bactéricides, filtre UV, etc...). La principale difficulté à surmonter de ce type de réaction réside dans le fait qu'il faut faire interagir par l'intermédiaire du biocatalyseur deux substrats de polarités très différentes. Comme cela a été décrit dans le chapitre 3, plusieurs paramètres cruciaux sont alors à prendre en considération afin de permettre la synthèse avec des cinétiques réactionnelles et des rendements satisfaisants. Ces paramètres correspondent par exemple à la nature du solvant employé, au choix de l'enzyme et de son conditionnement, au rapport molaire des deux substrats, à la nature du donneur d'acyle ou encore à la modification préliminaire du substrat hydrophile de manière à abaisser son hydrophilicité et favoriser ainsi sa solubilisation dans le solvant choisi ainsi que son contact avec le donneur d'acyle lipophile.

Les exemples du chapitre 3 illustrant les potentialités de la lipophilisation enzymatique de biomolécules montrent que les lipases peuvent être utilisées dans de multiples réactions impliquant des substrats très divers. Outre leur utilisation dans le domaine du biofaçonnement des corps gras, on constate que ces enzymes se révèlent tout aussi efficaces pour catalyser des réactions d'hydrophobation de substrats très hydrophiles tels que les sucres, les acides aminés et leur dérivés et enfin les molécules complexes de type polyphénols et acides phénoliques. Bien entendu, cette technologie de lipophilisation enzymatique peut probablement être

extrapolée aux macro-molécules telles que protéines et pourquoi pas polysaccharides. Le laboratoire de Lipotechnie a d'ailleurs acquis des premiers résultats en comparant les avantages et inconvénients des voies chimiques ou enzymatiques pour l'hydrophobation d'isolats de protéines de soja (Roussel *et al*, 1997). Ainsi, dans le cadre de l'UMR, et en ce qui concerne la fonctionnalisation douce des agroressources on peut envisager que j'intervienne sur la mise en œuvre des lipases pour des modifications rhéologiques et fonctionnelles de macromolécules afin d'obtenir par exemple des films barrières plus performants vis à vis de l'eau.

De plus, l'exemple donné dans ce même chapitre 3 sur la lipophilisation des acides phénoliques et polyphénols illustrent clairement les potentialités des molécules obtenues puisqu'elles conservent les activités biologiques des substrats polyphénoliques initiaux et présentent en plus des propriétés tensioactives leur conférant une efficacité accrue aux interfaces lipides/eau. Etant donné l'intérêt que je constate chez bon nombre de nos partenaires industriels des secteurs agroalimentaires, pharmaceutique ou cosmétique pour ces nouvelles molécules, il va de soit que je vais être également amené à poursuivre ces travaux de lipophilisation de polyphénols. En conséquence, on peut envisager que les résultats prometteurs obtenus avec les extraits de café vert (acides chlorogéniques) soient étendus à d'autres matières premières présentant des activités biologiques très comparables. Citons par exemple, les extraits polyphénoliques de romarin que l'on trouve en abondance sur le marché des antioxydants ou encore les margines d'olive considérée comme un déchet d'huilerie et qui pourtant sont à valoriser en raison de leur forte teneur en polyphénols.

Pour conclure, dans un contexte mondial où l'on se soucie de plus en plus de préservation de l'environnement, de meilleur partage des richesses, de développement durable et de valorisation des agroressources, je suis convaincu que la conception et le développement de nouveaux procédés et produits en utilisant des catalyseurs enzymatiques, *a fortiori* d'origine végétale, devraient connaître un essor considérable dans les années à venir. J'espère que les activités que je souhaite mener vont me permettre d'apporter ma « toute petite pierre à l'édifice ». Enfin, je terminerai en soulignant que le succès des travaux que j'envisage dépend inévitablement des échanges fructueux et enrichissants que je souhaite entretenir avec mes différents collègues tant au niveau de l'UMR et du CIRAD, qu'à l'échelle européenne et mondiale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baldwin J. E., Miranda T., Moloney M. (1989)
Amino Acid Synthesis using (L)-pyroglutamic Acid as a Chiral Starting Material.
Tetrahedron, 45, 7459-7468.
- Beisson F. Tiss A., Rivière C. Verger R. (2000)
Methods for lipase detection and assay : a critical review.
Eur. J. Lipid Sci. Technol., 133-153.
- Bell S.J., Bradley D., Forse R.A.A., Bistrian B.R. (1997)
The new dietary fats in health and disease,
J. Am. Diet. Assoc., 97, 280-286.
- Beveridge J.M.R., Haust H.L, Connel W.F. (1964)
Magnitude of the hypocholesterolemic effect of dietary sistosterol in man.
Journal of Nutrition, 83, 119-122.
- Binns F., Roberts S.M., Taylor A., Williams C.F. (1993)
Enzymic polymerization of an unactivated Diol/Diacid System.
J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 899-903.
- Björkling F., Godtfredsen S.E., Kirk O. (1989)
A highly selective enzyme-catalyzed esterification of simple glucosides
J. Chem. Soc. Chem. Commun, 934-935.
- Black J.G., Scott I.R. (1993)
Pyroglutamic acid esters, their synthesis and use in tropical products.
Brevet USA, n: 5, 190, 980.
- Bornscheuer U.T. (1995)
Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols.
Enz. Microb. Tech., 17, 578-586.

Bousquet M.P., Willemot R.M., Monsan P., Boures E. (1999)

Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications.

Biotech. Bioeng., 63, 730-736.

Caro Y., Dhuique-Mayer C., Turon F., Pina M., Reynes M., Graille J. (2001)

The Biocatalytic Activity of Bromelain in Ester Synthesis Reaction: Difference Between the Intrinsic Lipase Activity and Thermal Catalysis.

Biotech. Lett., 23, 2035-2039.

Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D.V., Attwood P., Graille J. (2002)

Plant lipases : Biocatalyst Aqueous Environment in Relation to Optimal Catalytic Activity in Lipase-Catalyzed Synthesis Reactions.

Biotech. Bioeng., 77, 693-703.

Castillo E., Marty A., Combes D., Condoret J.S. (1994)

Polar substrates for enzymatic reactions in supercritical CO₂: How to overcome the solubility limitation.

Biotech. Lett., 16, 169-174.

Chahid Z., Montet D., Pina M., Bonnot F., Graille J. (1994)

Biocatalyzed octylglycoside synthesis from a disaccharide.

Biotech. Lett., 16, 795-800.

Chandler I.C., Howarth O.W., Crout D.H.G (2001)

Measuring stereoselectivity in lipase- catalyzed acidolysis reactions by ultra high resolution ¹³C nuclear magnetic resonance.

J. Am. Oil Chem. Soc., 78, 953-958.

Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M., (2001)

Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids.

Livestock Prod. Sci., 70, 31-48.

Clifford M.N.(1985)

Chlorogenic Acids.

RJ Clark, Macrae R., Eds. Coffee, Vol. 1, Chemistry: Elsevier Applied Science, London, pp153-202.

Conde S., Lopez-Serrano P., Martinez A. (1999)

Candida antarctica lipase B catalysed amidation of pyroglutamic acid derivatives: A reaction Survey.

J. Mol. Catal. B. Enz., 7, 299-306.

Donovan D.C., Schingoethe D.J., Baer R.J., Rylai J., Hippen A.R., Franklin S.T. (2000)

Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows.

J. Dairy Sci., 83, 2620-2628.

Faber K, Riva S. (1992)

Enzyme catalyzed irreversible acyl transfer.

Synthesis, 895-910.

Frey-Wyssling A. (1935)

Die Stoffausscheidung der Hohoren Pflanzen: Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere, Julius Springer, (Berlin), pp 32.

Gao C., Whitcombe M.J., Vulfson E.N. (1999)

Enzymatic synthesis of dimeric and trimeric sugar fatty acid esters.

Enz. Microb. Tech., 25, 264-270.

Giordani R., Moulin A., Verger R. (1991)

Tributyrolylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices.

Phytochemistry, 30, 1069-1072.

- Gridley J.J., Hacking A.J., Osborn H.M., Spackman D.G. (1998).
Regioselective lipase-catalyzed acylation of 4,6-O benzylidene- α and β -D-pyranoside derivatives displaying a range of anomeric substituents.
Tetrahedron, 54, 17925-14946.
- Guillardeau L., Montet D., Khaled N., Pina M., Graille J. (1992)
Synthèse du caprylate de fructose par biocatalyse en l'absence de solvant.
Tenside, 29, 5, 342-344.
- Guyot B., Gueule D., Pina M., Graille J., Farines V., Farines M. (2000)
Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeoyl quinic acid.
Eur. J. Sci. Technol., 102, 93-96.
- Haas M.J., Kramere J.K.G., Mc Neill G., Scott K., Foglia T.A., Sehat N., Frischte J, Mossoba M.M., Yurawecz M.P. (1999)
Lipase-catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers.
Lipids, 34, 979-987.
- Hamilton R.J., Kalu C., Mc Neill G.P, Padley F.B., Pierce J.H. (1998)
Effects of Tocopherols, Ascorbyl Palmitate and Lecithin on Autoxidation of Fish Oil.
J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 813-822.
- Haslbeck F., Senser F., Grozch W. (1985)
Anchweis Niedriger Lipase-Aktivitäten in Lebensmitteln.
Z. Lebensm./Unters. Forsch., 181, 271-275.
- Heinemann T., Leiss O., Von Bergmann K. (1986)
Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia.
Atherosclerosis, 61, 219-223.
- Hellyer S.A., Chandler I.C., Bosley J.A. (1999)
Can the Fatty Acid Selectivity of Plant Lipases be Predicted from the Composition of the Seed Triglyceride?
Biochim. Biophys. Acta, 1440, 215-224.

Hills M.J., Kiewitt I., Mukherjee K.D. (1989)

Enzymatic Fractionation of Evening Primrose Oils by Rape Lipase: Enrichment of gamma Linolenic Acid.

Biotech. Lett., 11, 629-632.

Hills M.J., Kiewitt I., Mukherjee K.D. (1990)

Lipase from *Brassica Napus* L. Discriminates Against *cis*-4 and *cis*-6 Unsaturated Fatty Acids and Secondary and Tertiary Alcohols.

Biochim. Biophys. Acta, 1042, 237-240.

Hills M.J., Kiewitt I., Mukherjee K.D. (1990b)

Enzymatic Fractionation of Evening Primrose Oils by Rape Lipase: Enrichment of gamma Linolenic Acid and Docohexaenoic Acid by Selective Esterification Catalyzed by Lipases.

J. Am. Oil Chem. Soc., 67, 561-564.

Jin R.H., Nishikubo T. (1993)

New ring opening reaction of epoxides with chloro substituted aromatic and heteroatomic compounds.

Synthesis, 28-30.

Jones P.J., Raeini-Sarjaz M., Ntanios F.Y., Vanstone C.A., Feng J.Y., Parsons W.E. (2000).

Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters.

Journal of Lipid Research, 41, 697-705.

Jose A., Takeru H. (1991)

Pyroglutamic acid esters used as dermal penetration enhancers for drugs.

Brevet USA N° 5, 066, 648.

Lang S., Syltatk C., Rau U. (2000)

Enzymatic synthesis and modification of glycolipids.

UT Bornscheuer ed. Enzymes in Lipid Modification. Weinheim :Wiley-VCH, pp 361-393.

Larock R.C., Dong X., Chung S., Reddy C.K., Helers L.E. (2001)

Preparation of conjugated soybean oil and other natural oils and fatty acids by homogeneous transition metal catalysis.

J. Am. Oil Chem. Soc., 78, 447-453.

Lees A.M., Mok H.Y., Lees R.S., McCluskey M.A., Grundy S.M. (1977)

Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance.

Atherosclerosis, 28, 325-328.

Li Y., Rethwisch D.G. (2002)

Scale up of Pseudo Solid-Phase Enzymatic Synthesis of alpha Methyl Glucoside Acrylate. Biotech. Bioeng., 79, 15-22.

Li H., Sakamoto T., Kikugawa Y. (1997)

Stereoselective Synthesis of *cis*-5-Alkyl-(S)-prolines from (S)-Pyroglutamic Acid *via* 5-Alkyl-5-hydroxy-(S)-prolines.

Tet. Lett., 38, 6677-6680.

Lin Y.H, Charles Y.U, Huang A.H.C. (1986)

Substrates specificities of lipases from corn and other seeds.

Arch. Biochem. Biophys., 244, 346-356.

Linko Y.Y., Wang Z.L., Seppala J. (1995)

Lipase-catalyzed synthesis of poly (1,4-butyl sebacate) from sebacic acid or its derivatives with 1,4-butanediol.

J. Biotech., 40, 133-138.

Mc Neill G.P., Rawlins C., Peilow A.C. (1999)

Enzymatic enrichment of conjugated linoleic acid isomers and incorporation into triglycerides.

J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 1265-1268.

Mannese M.L.M., Cox R.C., Koops B.C., Verheij H. M., De Haas G.H., Egmond M.R., van der Hijden H.T.W.M., de Vlieg J. (1995)

Cutinase from *Fusarium solani pisi* hydrolysing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity.

Biochemistry, 34, 6400-6407.

Maruta Y., Kawabata J., Niki R. (1995)

Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock.

J. Agric. Food Chem., 43, 2592-2596.

Mir Z., Goonewardene L.A., Okine E, Jaegar S., Scheer H.D. (1999)

Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk.

Small Ruminant Res., 33, 137-143.

Mir Z., Rushfeldt M.L., Mir P.S., Paterson L.J., Weselake R.J. (2000)

Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues.

Small Ruminant Res., 36, 25-31.

Montet D, Servat F., Pina M., Graille J., Ledon M., Marcou L. (1990)

Synthèse de N-acyllysine par voie enzymatique.

J. Am. Oil Chem. Soc., 67, 771-774.

Muderhwa J., Pina M., Graille J. (1988)

Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3, II-Taux de conversion et glycérides partiels en fonction de l'activité de l'eau des biocatalyseurs.

Oléagineux, 43, 427-432.

Mukherjee K.D. (1995)

Plant Lipases in Lipid Biotransformation: Engineering of/with Lipases. Eds F. X.Malcata.

Kluwer Academic Elsevier (Dordrecht), pp 391-401.

Mukherjee K.D., Kiewitt.L. (1998)

Substrate Specificity of Lipases in Proteases Preparations.

J. Agric. Food Chem., 46, 2427-2432.

Mutua L.N., Akoh C.C. (1993)

Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non aqueous media by *Candida* sp lipase.

J. Am. Oil Chem. Soc., 70, 43-46.

Naudet N. (1976)

Interestérification et estérification. Mécanismes réactionnels et conséquences sur la structure.

Rev. Fr. Corps Gras, 23, 387-391.

Ncube I, Gitlesen T., Adlercreutz P., Read J.S., Mattiasson B. (1995)

Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed.

Biochim. Biophys. Acta, 1257, 149-156.

Ogawa J., Mastumura K., Kishino S., Omura Y., Shimizu S. (2001)

Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecanoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*.

Appli. Environ. Microbiol., 67, 1246-1252.

O'Shea M., Devery R., Lawless F., Koegh K., Stanton T. (2000)

Enrichment of the conjugated linoleic acid content of bovine milk by dry fractionation.

Int. Dairy J., 10, 289-294.

Ota Y., Itabashi Y., Hasuo M. (1996)

Measurement of positional specificity index of microbial lipases by chiral phase high-pressure liquid chromatography.

Biosci. Biotech. Biochem., 60, 145-146.

- Otto R.T., Bornscheuer U.T., Schreib H., Pleiss J., Syldatk C., Schmidt R.D. (1998)
Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters.
Biotechnol. Lett., 20, 1091-1094.
- Plenat F., Renard G., Christol H. (1980)
Ouverture acido-catalysée d'époxydes bicyclo [2.2.2] octaniques : Intervention d'un mécanisme A2 avec rétention de configuration.
Bull. Soc. Chim. Fr., 3, 125-132.
- Piazza G.J. (1991b)
Generation of Polyunsaturated Fatty Acids from Vegetable Oils using the Lipase from Ground Oat (*Avena sativa* L) Seeds as a Catalyst.
Biotech. Lett., 13, 173-178.
- Piazza G.J., Bilyk A., Brower D.P., Haas M.J.(1992)
The Positional and Fatty Acid Selectivity of Oat Seed Lipase in Aqueous Emulsions.
J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 978-981.
- Piazza G.J., Bilyk A., Schwartz D., Haas M.J.(1989)
Lipolysis of Olive Oil and Tallow in an Emulsifier-Free Two Phases System by the Lipase from Oat Seeds (*Avena sativa* L.).
Biotech. Lett., 11, 487-492.
- Piazza G.J., Farrel H.M. (1991a)
Generation of Ricinoleic Acid from Castor Oil Using the Lipase from Ground Oat (*Avena sativa* L) Seeds as Catalyst.
Biotech. Lett., 13, 179-184.
- Pinsirodom P., Parkin K.L. (1999)
Fatty acid and Product Selectivities of Potato Lipid Acyl Hydrolase in Esterification reactions with Glycerol in Organic Media.
J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 1119-1125.

- Pokorny J., Davidek J., Vierecklova M., Ranny M., Sedlacek J. (1990)
Effect of Phosphorylated Acylglycerols on the Oxidative Stability of Oils.
Die Nahrung, 34, 719-725.
- Radlove S.B., Dejong W.M., Falkenburg L.B. (1948)
A continuous process for the dehydration of castor oil.
J. Am. Oil Chem. Soc., 268-271.
- Rainio A, Vahvaselka M., Suomalainen T., Laakso S. (2001)
Reduction of linoleic inhibition in production of conjugated linoleic acid by
Propionibacterium freudenreichii ssp. *Shermanii*.
Can. J. microbiol., 47, 735-740.
- Ransac S., Rogalska E., Gargouri Y., Deveer A.M.T., Paltauf F., De Haas G.H., Verger R. (1990)
Hydrolysis of enantiomeric glyceride analogues by gastric and pancreatic lipases; a kinetic study using the monomolecular film technique.
J. Biol. Chem., 265, 20263-20270.
- Rao K.S., Paulose M.M. (1992)
A Process for Splitting Castor Oil at Ambient Temperature using Homogenised Castor Seed as Lipase Source.
Res. Ind., 37, 36-37.
- Redmann I., Pina M., Guyot B., Blaise P., Farines M., Graille J. (1997)
Chemo enzymatic synthesis of glucose fatty esters.
Carbohydrate Research, 300, 103-108.
- Rogalska E., Cudrey C., Ferrato F., Verger R. (1993)
Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases.
Chirality, 5, 24-30.

Rogalska E., Ransac S., Verger R. (1990)

Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases.

J. Biol. Chem., 265, 20271-20276.

Roussel C., Pina M., Graille J., Huc A., Perrier E., (1997)

Lipophilisation des protéines biocatalysées par des lipases : cas des isolats des protéines de soja.

OCL, 4, 284-290.

Saebo A. (2001)

Commercial production of conjugated linoleic acid.

Lipid Technol. Newsl., 7, 9-13.

Salminen I., Mutanen M., Jauhiainen M., Aro A. (1998)

Dietary *trans* fatty acids increase conjugated linoleic acids levels in human serum.

J. Nutr. Biochem., 9, 93-98.

Sarney D.B., Kapeller H., Fregapane G., Vulfson E.N. (1994)

Chemo-enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters.

J. Am. Oil Chem. Soc., 71, 711-714.

Shimada Y., Hirota Y., Baba T., Sugihara A., Moriyama S., Tominaga Y., Terai T. (1999).

Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids.

J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 713-716.

Scholtz E., Heinrich M., Hunkler D. (1994)

Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*.

Planta Med., 60, 360-364.

Sonnet P.E. (1991)

A short highly regio and stereoselective synthesis of triacylglycerols.

Chem. Phys. Lipids, 58, 35-39.

Sonnet P.E., Gazzillo J.A. (1991)

Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis.

J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 11-15.

Steffen B., Ziemann A., Lang S., Wagner F. (1992).

Enzymatic monacylation of trihydroxycompounds.

Biotech. Lett., 14, 773-778.

Terrill R.L. (1950)

Dehydration of castor oil.

J. Am. Oil Chem. Soc., 27, 477-481.

Therisod M., Klibanov A.M. (1986)

Facile enzymatic preparations of monoacylated sugars in pyridine.

J. Am. Oil Chem. Soc., 108, 5638-5640.

Tüter M. (1998)

Castor Bean Lipase as a Biocatalyst in the Esterification of Fatty Acids to Glycerol.

J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 417-420.

Verger R., Rivière C. (1987)

Les enzymes lipolytiques : une étude cinétique.

Rev. Fr. Corps Gras, 34, 7-13.

Waheeduddin M., Siva Samban M.A., Aggarwal J.S. (1966)

A comparative study of some catalysts for the dehydration of castor oil.

Paintindia, 24-26.

Wang Z.L., Hiltunen K., Orava P., Seppala J., Link Y.Y. (1996)

Lipase-polyester synthesis.

J. Macro. Sci. Appl. Chem., A33, 599-612.

Weber H.K., Stecher H., Faber K. (1995)

Sensitivity of microbial lipases to acetaldehyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters.

Biotech. Lett., 17, 803-808.

Wehtje E., Adlercreutz P. (1997)

Water activity and substrate concentration effects on lipase activity.

Biotech. Bioeng., 55, 798-806.

Werman M.J., Lotan N., Neeman L. (1995)

Lipolytic Activity of white Pepper Powder at high Temperatures in nonaqueous System.

J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 413-416.

Weststrate J.A., Meijer G.W. (1998).

Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects.

European Journal of Clinical Nutrition, 52, 334-343.

Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Pariza M.W. (1999)

NELSON GJ Eds. Advances in Conjugated Linoleic Acid Research., Vol 1, AOCS Press, Champaign, USA.

Zambiasi R.C., Przybylski R. (1998)

Effect of Endogenous Minor Components on the Oxidative Stability of Vegetable Oils.

Lipid Technol., 58-62.

Zandonella G., Haalck L., Spener F., Faber K., Paltauf F., Hermetter A. (1995)

Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacylglycerols. Effects of substrate solubilization.

Eur. J. Biochem., 231, 50-55.